

JP11513498

Publication Title:

USE OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TO IDENTIFY LIGANDS TO
TARGET BIOMOLECULES

Abstract:

Abstract not available for JP 11513498

(T) Abstract of corresponding document: WO 9718471

(A1) The present invention provides a process for identifying compounds which bind to a specific target molecule. The process includes the steps of: a) generating a first two-dimensional $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR correlation spectrum of a ^{15}N -labeled target molecule; b) exposing the labeled target molecule to one or a mixture of chemical compounds; c) generating a second two-dimensional $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR correlation spectrum of the labeled target molecule that has been exposed to one or a mixture of compounds in step (b); and d) comparing said first and second two-dimensional $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR correlation spectra to determine differences between said first and said second spectra, the differences identifying the presence of one or more compounds that are ligands which have bound to the target molecule.

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-513498

(43) 公表日 平成11年(1999)11月16日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

F I

G 0 1 R 33/465

G 0 1 N 24/08

5 1 0 Q

G 0 1 N 33/15

33/15

Z

33/566

33/566

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 63 頁)

(21) 出願番号 特願平9-519074
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996)11月13日
 (85) 翻訳文提出日 平成10年(1998)5月13日
 (86) 国際出願番号 PCT/US96/18270
 (87) 国際公開番号 WO97/18471
 (87) 国際公開日 平成9年(1997)5月22日
 (31) 優先権主張番号 08/555, 691
 (32) 優先日 1995年11月14日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, IL, J P, MX

(71) 出願人 アボット・ラボラトリーズ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、
 アボット・パーク、アボット・パーク・ロ
 ード・100、チャド・0377/エイ・ピー・
 6・デイー2
 (72) 発明者 フェシツク、ステイーブン・ダブリユ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガー
 ニー、ボーツマス・サークル・1099
 (72) 発明者 ハジユク、フィリップ・ジェイ
 アメリカ合衆国、イリノイ・60074、バラ
 タイン、コンステイテューション・693・
 ナンバー・3
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外1名)

(54) 【発明の名称】 生体分子の標的用リガンドを同定するための核磁気共鳴の使用

(57) 【要約】

本発明は、特定の標的分子に結合する化合物の同定方法を提供する。本発明の方法は、a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを発生させるステップ、b) 前記した標識標的分子を1つの化学化合物または化学化合物の混合物に作用させるステップ、c) ステップb) で1つの化合物または化合物の混合物に作用させた標識標的分子の第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを発生させるステップ、及びd) 第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルと第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを比較して第1と第2のスペクトルの違いを調べ、その違いから標的分子に結合したリガンドである1つまたはそれ以上の化合物の存在を同定するステップを含む。

【特許請求の範囲】

1. 特定の標的分子に結合するリガンドである化合物を同定するための化合物のスクリーニング方法であって、

- a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、
- b) 前記した標識標的分子を1つまたはそれ以上の化学化合物に作用させるステップ、
- c) ステップb) で1つまたはそれ以上の化合物に作用させた標識標的分子の第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、及び
- d) 第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルと第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを比較して第1と第2のスペクトルの違いを調べ、その違いから標的分子に結合したリガンドである1つまたはそれ以上の化合物の存在を同定するステップを含むことを特徴とする方法。

2. ステップb) において ^{15}N -標識標的分子を化学化合物の混合物に作用させ、更にステップd) に続いて

- e) ^{15}N -標識標的分子を個別に前記混合物中の各化合物に

作用させるステップ、

- f) 個別に各化合物に作用させた標識標的分子の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、及び
- g) ステップf) で発生した各スペクトルと第1スペクトルを比較して第1スペクトルと各化合物のスペクトルの違いを調べ、その違いから標的分子に結合したリガンドである化合物の存在を同定するステップを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルの違いが標的分子中の特定の ^{15}N -標識サイトの化学シフト及び前記 ^{15}N -標識サイトに結合したプロトンの化学シフトであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

4. 標的分子がポリペプチドである請求項1に記載の方法。

5. 標的分子と前記標的分子に結合するリガンド間の解離定数を測定する方法

であって、

a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、

b) 前記した標識標的分子を濃度の異なるリガンドに作用させるステップ、

c) ステップb) の各濃度のリガンドで2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、

d) ステップc) で発生させた各スペクトルをステップa) で発生させた第1スペクトル及びステップc) で発生させた他のすべてのスペクトルと比較してスペクトル間の違いをリガンド濃度の違いの変化の関数として定量するステップ、及び

e) 前記した違いから、式

$$K_D = \frac{([P]_0 - x)([L]_0 - x)}{x}$$

{式中、 $[P]_0$ は標的分子の総モル濃度であり、 $[L]_0$ はリガンドの総モル濃度であり、 x は式

$$x = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{free}}}{\Delta}$$

(ここで、 δ_{obs} 及び δ_{free} はそれぞれリガンドの各濃度で測定した標的分子に対する化学シフト値及びリガンド不在下での標的分子に対する化学シフト値であり、 Δ は飽和量のリガンド及び δ_{free} での化学シフト間の差である) に従って決定される結合種のモル濃度である}

に従って標的分子とリガンド間の解離定数を算出するステップ

を含むことを特徴とする方法。

6. 標的分子がポリペプチドであることを特徴とする請求項5に記載の方法。

7. 更にステップa) の前に、標識標的分子を第2リガンドに結合させるステップを含むことを特徴とする請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

生体分子の標的リガンドを同定するための核磁気共鳴の使用

発明の技術分野

本発明は、標的生体分子に結合するリガンドを同定及び設計するために、2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトル分析を用いて生物活性について化合物をスクリーニングする方法及び結合または解離定数を測定する方法に関する。

発明の背景

新規リード薬物を発見するための最も有力な方法のひとつは、合成化学物質及び天然物のデータベースを無作為にスクリーニングして特定の標的物質に結合する化合物を発見する方法（即ち、前記標的のリガンドの同定）である。この方法を用いて、標的分子と物理的結合を形成する能力または標的分子の機能を変更する能力に基づいてリガンドを同定することができる。

物理的結合を求めている場合には、典型的には標的物質をリガンドであろうと推測される1つまたはそれ以上の化合物に作用させ、標的物質と前記した1つまたはそれ以上の化合物との間で複合体が形成されるかどうか調べるべくアッセイが行われ

る。前記アッセイでは、当業界では公知のように、複合体形成の指標となる標的分子の概略的变化（例えば、サイズ、電荷及び移動度の変化）を試験する。

機能的変化を調べる場合には、標的分子に関連する生物学的もしくは化学的事象（例えば、酵素触媒反応、受容体媒介の酵素活性化）を測定することができるアッセイ条件を確立する。変化を確認するためには、標的分子を試験化合物に作用させる前及びその後に標的分子の機能を調べる。

既存の物理的及び機能的アッセイは、治療用化合物を設計するために使用される新規リード薬物を同定するために首尾良く使用されてきた。しかしながら、これらのアッセイには正確さ、信頼性及び効率を妥協せざるを得ない固有の限界がある。

既存のアッセイの重大な欠点は、「偽陽性」の問題である。典型的な機能的アッセイでは、「偽陽性」は、アッセイを誘発するが所望の生理学的応答を引き出

すのには有効でない化合物で生ずる。典型的な物理的アッセイでは、例えば標的に結合するものの非特異的に結合する（例えば、非特異的結合）化合物で生ずる。偽陽性は、想定リガンドをより高濃度でスクリーニングしたときに特に生じやすい問題である。なぜならば、多く

の化合物は前記高濃度では非特異的な影響を受けるからである。

同様に、既存のアッセイには、実際には標的に対するリガンドである化合物がアッセイにおいて陰性の結果を示す「偽陰性」の問題もある。偽陰性は、典型的には、試験化合物の標的に対する結合または解離定数に比して余りにも高いか（毒性が生ずる）または余りにも低い濃度の試験化合物をアッセイで使用したときに生ずる。

既存のアッセイの別の重大な欠点は、アッセイにより得られる情報量に限度があることである。既存のアッセイは、標的分子に結合するかまたは標的分子から応答を引き出す化合物を正確に同定できるとしても、標的分子上の特定結合サイトに関する情報も試験化合物と標的分子間の構造／活性関係に関する情報も提供しない。上記した情報を提供できないことは、スクリーニングアッセイを更なる研究のためのリードを同定するために使用するとき特に問題である。

最近、有機溶媒の巨大分子上の結合サイトを同定するためにX線結晶学を使用することが示唆された。しかしながら、この方法では標的上の異なるサイトの相対結合アフィニティーを測定することができない。この方法は、高濃度の有機溶媒の存在

下でも変性しない非常に安定な標的タンパク質に対して使用されるのみである。また、この方法は、化学的に多種多様の化合物を迅速に試験するためのスクリーニング方法ではなく、個々の結晶構造を測定するのに長時間を要するためにほんの数種の有機溶媒の結合サイトをマッピングするためにのみ使用される。

化合物は、標的生体分子の機能を変える新規薬物の設計に使用し得るリードを同定するためにスクリーニングにかけられる。これらの新規化合物は同定されたリードと構造的に類似しているか、または前記リード化合物の1つまたはそれ以

上の複合体を形成し得る。既存のスクリーニング方法には固有の諸問題があるために、既存の方法が新規薬物の設計に殆ど役立たないことが多い。

特定の標的に対して特異的に結合するリガンドを同定及び設計するために化合物をスクリーニングする新しい、迅速で、効率的で、正確且つ信頼性ある方法の提供が常に要望されている。

発明の要旨

第1に、本発明は、特定の標的分子に結合するリガンドを同定するために生物活性に関して化合物をスクリーニングする方

法を提供する。本発明の方法は、

- a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、
- b) 前記した標識標的分子を1つまたはそれ以上の化学化合物に作用させるステップ、
- c) ステップb) で1つまたはそれ以上の化合物に作用させた標識標的分子の第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、及び
- d) 第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルと第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを比較して第1と第2のスペクトルの違いを調べ、その違いから標的分子に結合したリガンドである1つまたはそれ以上の化合物の存在を同定するステップを含む。

本発明の方法のステップb) において2種以上の化合物、すなわち化合物の混合物をスクリーニングし、標的分子単独から発生させたスペクトルと混合物の存在下での標的分子から発生させたスペクトルの違いを調べる場合には、前記混合物中に含まれるどの化合物または化合物の組み合わせが標的分子に結合するかを同定するために追加のステップを実施する。これらの

追加のステップは、

- e) ^{15}N -標識標的分子を前記混合物中の各化合物に個別に作用させるステップ

f) 個別に各化合物に作用させた標識標的化合物の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを発生させるステップ、及び

g) ステップ f) で発生させた各スペクトルと標的分子単独から発生させた第1スペクトルを比較して第1スペクトルと各化合物のスペクトルの違いを調べ、その違いから標的分子に結合したリガンドである化合物の存在を同定するステップを含む。

2次元相関スペクトルにおける特定の $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ シグナルの化学シフト値は標的分子中の原子団（例えば、アミドのN-H原子、またはポリペプチド中の特定のアミノ酸残基のペプチド結合）の既知の特定位置に対応しているのて、本発明の方法によりどの化合物が特定の標的分子に結合しているか同定することも、標的分子上のリガンドの特定結合サイトを決定することもできる。

第2に、本発明は、所与のリガンド及びその標的分子の解離定数 K_D を測定する方法を提供する。この方法は、

a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR

相関スペクトルを発生させるステップ、

b) 前記した標識標的分子を濃度の異なるリガンドに作用させるステップ、

c) ステップ b) の各濃度のリガンドにおいて2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを発生させるステップ、

d) ステップ c) で発生させた各スペクトルをステップ a) で発生させた第1スペクトルと比較するステップ、及び

e) その違いから、式

$$K_D = \frac{([P]_0 - x)([L]_0 - x)}{x}$$

に従って標的分子とリガンド間の解離定数を算出するステップを含む。

本発明の利点は、本発明の方法により、すでにリガンドに結合している第2分子の存在下で標的分子と1つのリガンド間の解離定数を測定することができることである。このことは、リガンドの標的分子基質への結合を測定する「ウェットケミカル」分析法を用いる従来方法では通常不可能である。

この好ましい実施態様では、リガンドの解離定数を測定する方法は第2の結合リガンドの存在下で実施され得る。この実施

態様によれば、¹⁵N標識標的物質は、標的が試験化合物に作用する前に第2リガンドに結合している。

本発明の方法によれば1つのリガンドと標的分子間の結合の存在も第2の結合リガンドの存在下での特定の結合サイトも調べることができるので、リガンドから構成される2つ以上の結合部分を含む薬物を本発明の方法により設計することができる。

本発明の方法は、標的分子に結合する第1及び次のリガンドを同定するために、上記した2次元¹⁵N/¹H NMR関連スペクトルによるスクリーニング方法を使用する。標的分子と2個以上のリガンドの複合体を形成し、この複合体の3次元構造を好ましくはNMR分光分析法及びX線結晶学を用いて測定する。3次元構造は、リガンドの他のリガンドに対する及び標的分子に対する立体配向を調べるために使用される。

立体配向に基づいて、リガンドを相互に結合して薬物を形成する。有機化学分野で公知の結合角及び結合長の情報の原理に基づいてリガンドの立体配向を別のリガンド及び標的分子に対して維持することにより、適切な結合基を選択する。

従って、分子設計方法は、標的分子に対する第1のリガンド部分を2次元¹⁵N/¹H NMR関連分光分析法を用いて同定

し、標的分子に対する次のリガンド部分を2次元¹⁵N/¹H NMR関連分光分析法を用いて同定し、標的分子に対して第1及び次のリガンド部分の複合体を形成し、前記複合体の3次元構造、よって標的分子上の第1及び次のリガンド部分の立体配向を調べ、リガンド部分の立体配向を維持すべく第1及び次のリガンド部分を結合して薬物を形成することからなる。

次のリガンド部分の同定は、第1リガンドの存在または不在下で実施され得る（例えば、第2リガンドを同定するために、標的分子は試験化合物に作用させる前に第1リガンドに結合され得る）。

好ましい実施態様では、スクリーニング方法または設計方法において使用される標的分子はポリペプチドである。ポリペプチドは好ましくは、ポリペプチドをコートするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞を、組換え産生されたポリペプチドが¹⁵Nで標識されるように¹⁵Nの同化可能源を含む培地中で培養することにより、該宿主細胞から組換え型で産生される。

図面の簡単な説明

本明細書の一部をなす図面において、

図1は、均一に¹⁵N-標識されたヒトパピローマウィルスE2のDNA結合ドメインの¹⁵N/¹H相関スペクトルを示す。スペクトル(80複合ポイント(complex points)、4スキャン/fid)は、20mMホスフェート(pH6.5)、10mMジチオトレイトール(DTT)及び10%酸化ジウテリウム(D₂O)中に0.5mMのE2を含むサンプルで得たものである。

図2は、最終試験化合物を添加前(薄い複数の等高線)及び添加後(濃い単一等高線)の、均一に¹⁵N-標識されたヒトパピローマウィルスE2のDNA結合ドメインの¹⁵N/¹H相関スペクトルを示す。化合物の最終濃度は1.0mMであった。他の条件はすべて図1に記載の通りである。結合時に有意な変化を示す特定残基を図示する。

図3は、第2の試験化合物を添加前(薄い複数の等高線)及び添加後(濃い単一等高線)の、均一に¹⁵N-標識されたヒトパピローマウィルスE2のDNA結合ドメインの¹⁵N/¹H相関スペクトルを示す。化合物の最終濃度は1.0mMであった。他の条件はすべて図1に記載の通りである。結合時に有意な変化を示す特定残基を図示する。

図4は、試験化合物を添加前(薄い複数の等高線)及び添加後(濃い単一等高線)の、均一に¹⁵N-標識されたストロメライシンの触媒ドメインの¹⁵N/¹H相関スペクトルを示す。化合物の最終濃度は1.0mMであった。スペクトル(80複合ポイント、8スキャン/fid)は、20mMTRIS(pH7.0)、20mMCaCl₂及び10%D₂O中に0.3mMのSCDを含むサンプルで

得たものである。結合時に有意な変化を示す特定残基を図示する。

図5は、試験化合物を添加前（薄い複数の等高線）及び添加後（濃い単一等高線）の、均一に ^{15}N -標識されたRAFペプチド（残基55-132）のRas結合ドメインの $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 相関スペクトルを示す。化合物の最終濃度は1.0 mMであった。スペクトル（80複合ポイント、8スキャン/fid）は、20 mMホスフェート（pH 7.0）、10 mM DTT及び10% D_2O 中に0.3 mMのRAF断片を含むサンプルで得たものである。結合時に有意な変化を示す特定残基を図示する。

図6は、試験化合物を添加前（薄い複数の等高線）及び添加後（濃い単一等高線）の、均一に ^{15}N -標識されたFKBPの $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 相関スペクトルを示す。化合物の最終濃度は1.0

mMであった。スペクトル（80複合ポイント、4スキャン/fid）は、50 mMホスフェート（pH 6.5）、100 mM NaCl及び10% D_2O 中に0.3 mMのFKBPを含むサンプルで得たものである。結合時に有意な変化を示す特定残基を図示する。

図7は、E2のDNA結合ドメインのNMR誘導構造の第1描写を示す。対称ダイマーの2つのモノマーは頭-尾様式で配向しており、各モノマーのN-及びC-末端（1つのモノマーについてはN及びC、他方のモノマーについてはN^{*}及びC^{*}）を図示する。リボンには、第1の試験化合物に結合したときに有意な化学シフト変化（ $\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04 \text{ ppm}$ 、 $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1 \text{ ppm}$ ）を示す残基を示す。これらの残基はE2のDNA認識ヘリックスに対応する。わかりやすくするために特定残基に番号を付した。

図8は、E2のDNA結合ドメインのNMR誘導構造の第2描写を示す。対称ダイマーの2つのモノマーは頭-尾様式で配向しており、各モノマーのN-及びC-末端（1つのモノマーについてはN及びC、他方のモノマーについてはN^{*}及びC^{*}）を図示する。リボンには、第2の試験化合物に結合したときに

有意な化学シフト変化（ $\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04 \text{ ppm}$ 、 $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1$

p p m) を示す残基を示す。これらの残基は主にダイマー界面領域に位置する。わかりやすくするために特定残基に番号を付した。

図9は、ストロメライシンの触媒ドメインのNMR誘導構造の描写を示す。Nー及びCー末端を図示する。リボンには、試験化合物に結合したときに有意な化学シフト変化 ($\Delta \delta (^1\text{H}) > 0.04 \text{ p p m}$ 、 $\Delta \delta (^{15}\text{N}) > 0.1 \text{ p p m}$) を示す残基を示す。これらの残基はS1'結合サイトの一部を形成するか、または空間的にこのサイトに近接している。わかりやすくするために特定残基に番号を付した。

図10は、ストロメライシンの作用ドメインに結合した第1及び第2リガンドの3元複合体のリボンプロットを示す。

発明の詳細な説明

本発明は、治療目的の標的分子に結合するリガンドを同定するための迅速且つ効率的なスクリーニング方法を提供する。

リガンドは、核磁気共鳴 (NMR) 分光分析法を用いてデータベース中のリガンド化合物を添加したときの標的分子の化学シフトの変化を追跡して、標的分子 (例えば、タンパク質、核

酸等) に対する分子の結合を試験することにより同定される。

標的分子の化学シフトの変化をリガンド濃度の関数として分析すると、リガンドの生体分子に対する結合アフィニティーも測定される。

各リガンドに対する結合サイトの位置は、リガンドを添加したときに変化する生体分子の化学シフトの分析とリガンドと生体分子間の核オーバーハウザー効果 (NOE) から決定される。

上記した方法により同定されるリガンド間の構造/活性の関係についての情報を利用して、標的分子に対するリガンドとして使用される新規薬物を設計することができる。例えば、所与の標的分子に対して2つ以上のリガンドが同定された場合、これらのリガンドと標的分子との複合体が形成される。リガンドの他のリガンドに対する及び標的分子に対する立体配向は3次元構造から誘導される。立体配向は、2つのリガンドの結合サイト間の距離とこれらのサイトに対する各リ

ガンドの配向を規定する。

上記した立体配向データを用いて、2つ以上のリガンドを相互に結合させて新規リガンドを形成する。結合は、リガンドの他のリガンドに対する及び標的分子に対する立体配向を維持する

る方法で実施される。

本発明のNMRをベースとする発見方法には多くの利点がある。第1に、本発明の方法は、標的分子に対する結合を直接調べることによりリガンドを同定するので、偽陽性の問題が有意に減少する。本発明の方法は標的分子に対する特定結合サイトを同定するので、化合物が高濃度の標的分子に非特異的に結合するために生ずる偽陽性の問題が解消される。

第2に、本発明の方法は広範囲の解離定数で標的分子に特異的に結合する化合物を同定できるので、偽陰性の問題も有意に減少する。化合物に対する解離または結合定数は本発明の方法により測定することができる。

本発明の他の利点は、本発明の発見方法から提供される各リガンドに関するデータが豊富でありかつ詳細であることに起因する。

結合したリガンドの位置がリガンドを添加したときに変化する標的分子の化学シフトの分析及びリガンドと生体分子間の核オーバーハウザー効果から決定されるので、ターゲットに既に結合している第1リガンドの存在下で第2リガンドの結合を測定することができる。各種リガンドの結合サイトを同時に測

定できることから、当業者は、1) リガンド間の負または正の協同結合を規定することができる、2) リガンドの他のリガントに対する及び結合サイトに対する配向を適切に維持しながら2つ以上のリガンドを結合して単一の化合物とすることにより、新規薬物を設計することができる。

更に、複数の結合サイトが存在する場合には、標的分子の化学シフトの変化を添加したリガンドの濃度の関数として分析することにより、各結合サイトの異なる結合サイトに対する相対アフィニティーを測定することができる。所与の化合物に構造的に類似する複数の化合物を同時にスクリーニングすることにより、リ

ガンドについての詳細な構造／活性関係の情報を得ることができる。

第1に、本発明は、特定の標的分子に結合するリガンドを同定するための化合物のスクリーニング方法を提供する。この方法は、

- a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、
- b) 前記した標識標的分子を1つまたはそれ以上の化合物に作用させるステップ、
- c) ステップb) で1つまたはそれ以上の化合物に作用させた標識標的分子の第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させるステップ、及び
- d) 第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルと第2の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを比較して第1と第2のスペクトルの違いを調べ、その違いから標的分子に結合した1つまたはそれ以上のリガンドの存在を同定するステップを含む。

本発明の方法のステップb) において2種以上の化合物をスクリーニングし、スペクトルの違いを観察する場合には、どの化合物が標的分子に結合するかを同定するために追加のステップを実施する。これらの追加のステップは、個別に各化合物について2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 関連スペクトルを発生させ、各スペクトルと第1スペクトルを比較して、比較したスペクトル間に標的分子に結合したリガンドの存在を示す違いがあるかどうか調べることからなる。

任意の ^{15}N -標識標的分子を本発明の方法で 사용할 ことができる。医化学においてタンパク質が重要であるので、好ましい標的分子はポリペプチドである。標的分子は当業界で公知

の手段を用いて ^{15}N で標識され得る。好ましい実施態様では、標的分子は形質転換された宿主細胞を用いて形質転換型で調製され得る。特に好ましい実施態様では、標的分子はポリペプチドである。高分解NMRスペクトルを与え且つ部分的にもしくは均一に ^{15}N で標識され得るポリペプチドが使用され得る。均一に ^{15}N -標識されたポリペプチド標的分子の調製例は、実施例に記載されている。

十分量の均一に¹⁵N-標識されたポリペプチドを調製するための好ましい方法は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、形質転換された細胞を¹⁵Nの同化可能源を含む培地で培養することである。¹⁵Nの同化可能源は当業界で公知である。好ましい源は¹⁵N H₄C l である。

特定のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの調製方法は当業界で公知である。また、宿主細胞を前記ベクターで形質転換する方法及び形質転換された細胞を培養してポリペプチドを発現させる方法も当業界で公知である。

本発明のスクリーニング方法の第1ステップでは、標識された標的分子の2次元¹⁵N/¹H NMR 関連スペクトルを発生

すなわち取得する。2次元¹⁵N/¹H NMR 関連スペクトルを発生させる方法は当業界で公知である（例えば、D. A. Eganら、Biochemistry, 32 (8) : 1920-1927 (1993)、Bax, A., Grzesiek, S., Acc. Chem. Res., 26 (4) : 131-138 (1993) 参照）。

本発明のスクリーニング方法で典型的に記録されるNMRスペクトルは、2次元¹⁵N/¹H異核一量子相関（HSQC）スペクトルである。タンパク質の骨格アミドに対応する¹⁵N/¹Hシグナルは通常うまく分解されるので、各アミドの化学シフトの変化をモニターすることは容易である。

上記したスペクトルを発生させるとき、大きな水シグナルは勾配を妨害することにより抑制される。多数の化合物に関するNMRデータ（例えば、合成されたまたは天然に存在する小さな有機化合物のデータベース）の取得を助けるために、サンプル充填機を用いる。このサンプル充填機を用いると、全部で60個のサンプルを無人で流すことができる。こうして、典型的な取得パラメーター（自由誘導減衰（fid）当たり4スキャン）を用いて、100～120のHSQCスペクトルを24

時間で得ることができる。

NMRデータの処理を助けるために、コンピュータプログラムを使用して複数の2次元NMRデータ（ルーチン—自動相（*routine—automatically phase*）2次元NMRデータを含む）を変換し、自動的に処理する。個々のHSQCスペクトルをすぐに検分し、添加化合物用のビヒクル（DMSO）を含むものの添加化合物そのものを含まない対照サンプルのHSQCスペクトルと比較するようにデータをフォーマットすることにより、データは容易に分析され得る。2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 関連スペクトルを発生させる方法の詳細は実施例に記載されている。

^{15}N —標識標的分子（ポリペプチド）の代表的な2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 関連スペクトルを図1に示す（E2タンパク質のDNA結合ドメイン）。

第1のスペクトルを取得したら、標識された標的分子を1つまたはそれ以上の試験化合物に作用させる。2つ以上の試験化合物を同時に試験する場合には、複数の小分子のような化合物のデータベースを使用することが好ましい。典型的にはそのような分子を予め重水素化したジメチルスルホキシドに溶解する。

データベース中の化合物は所要または所望により業者から購入することもできるし、製造することもできる。

個々の化合物を、特にサイズ（分子量＝100～300）及び分子の違いに基づいて選択することができる。広範囲の結合サイトと相互作用する化合物を発見する可能性を最大限とするために、異なる形態（例えばフラットな芳香族環、皺のよった脂肪族環、一重、二重もしくは三重結合を有する直鎖または分枝鎖脂肪族化合物）及び多様の官能基（例えば、カルボン酸、エステル、エーテル、アミン、アルデヒド、ケトン及び各種複素環）を有する化合物を集める。

本発明のNMRスクリーニング方法では、約0.1～約10.0mMの範囲のリガンド濃度を使用することができる。この濃度で、酸性または塩基性である化合物は緩衝されたタンパク質溶液のpHを有意に変化させることができる。化学シフトはpH変化及び直接的な結合相互作用に応じて変化し、よってリガンドの結合ではなくpH変化の結果として起こる「偽陽性の」化学シフト変化を観察す

ることができる。従って、緩衝された溶液のpHがリガンドを添加しても変化しないようにしなければならない。pHをコントロールする1つの手段を下記する。

化合物を、ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の1.0M及び0.1Mストック溶液として263°Kで保存する。これは、水溶液中のリガンドの溶解度が限られているから必要である。DMSO溶液のpHを直接調節することはできない。更に、HCl及びNaOHはDMSO中で不溶性塩を形成するので、別の酸及び塩基を使用しなければならない。下記する方法が安定なpHをもたらすことが判明した。

DMSO中の1.0Mストック溶液を50mMホスフェート (pH7.0) で1:10に希釈する。こうして希釈した溶液アリコートのpHを測定する。アリコートのpHに変化が見られないときには (すなわち7.0が保たれているときには)、DMSOストック溶液を1:10に希釈して0.1M溶液とすることにより作業溶液を調製し、その溶液を保存する。

希釈したアリコートのpHが7.0未満のときには、エタノールアミンを1.0MストックDMSO溶液に添加し、該ストック溶液を更にリン酸緩衝液で1:10に希釈して別のアリコートを作成し、このアリコートのpHを再び調べる。

希釈したアリコートのpHが7.0よりも高いときには、酢酸を1.0MストックDMSO溶液に添加し、該ストック溶液

を更にリン酸緩衝液で1:10に希釈して別のアリコートを作成し、このアリコートのpHを再び調べる。

エタノールアミン及び酢酸はDMSOに可溶性であり、適切な量を添加して水性緩衝液に移したときにpHが変化しないようにする。pHの調節は、所望の結果が得られるまで繰り返し行われる交互作用 (i n t e r a c t i v e) 工程である。

この手順は、実験で使用する低濃度 (0.1~10mM) でまたは異なる/より弱い緩衝系でpHの変化が観察されないように1.0Mストック溶液の1:1

0希釈物(100mMリガンド)で実施されることに留意されたい。

¹⁵N-標識標的分子を1つまたはそれ以上の試験化合物に作用させた後、第2の2次元¹⁵N/¹H NMR関連スペクトルを発生させる。第2スペクトルを上記と同様に発生させる。次いで、第1と第2のスペクトルを比較して、2つのスペクトルの間に何らかの違いがあるかを調べる。リガンドの存在の指標となる2次元¹⁵N/¹H NMR関連スペクトルの違いは、標的分子中の¹⁵N-標識サイトに対応する。これらの違いは、当業界で公知の標準的な方法により測定される。

例えば、図2、3、4、5及び6は、各種標的分子を各種試

験化合物に作用させる前及びその後の関連スペクトルの比較を示す。上記した試験をどのように実施したかについては実施例2及び3に後記した。

2次元¹⁵N/¹H NMR関連スペクトル中の特定シグナルは、標的分子中の特定の窒素及びプロトン原子に対応する(例えば、タンパク質中のアミノ酸残基のアミド)。例えば、図2から分かるように、試験化合物に作用させたE2のDNA結合ドメインの2次元¹⁵N/¹H NMR関連スペクトルの化学シフトは、15(I15)、21(Y21)、22(R22)及び23(L23)残基において生ずる。

図2から分かるように、リガンドの結合は15位のイソロイシン(Ile)残基、21位のチロシン(Tyr)残基、22位のアルギニン(Arg)残基及び23位のロイシン(Leu)残基を含んでいた。従って、本発明の方法は、リガンドと標的分子の間の特定結合サイトを同定するためにも使用することができる。

各化合物への結合に係わるタンパク質の領域は、化合物を添加したときに変化する複数の特定アミドシグナルから同定される。これらのシグナルは、十分に確立されている多くの異核多

次元NMR実験を用い、標準的な手順によりタンパク質の各アミド基に帰属される。

タンパク質により強く結合する分子を発見するために、構造／活性の関係に基づいて試験するための分子が、タンパク質に結合したときの第1回のリードに関する第1回のスクリーン及び／または構造の情報からの選択される。例えば、第1回のスクリーニングにより、リガンドが同定され、それらのリガンドすべてが芳香族環を含むとすると、次回スクリーニングでは他の芳香族分子を試験化合物として使用する。

実施例2に後記するように、ストロメラシンの触媒ドメインに対する結合についての第1回スクリーニングアッセイでは、2つのビアリアル化合物がリガンドとして同定された。そこで、第2回スクリーニングでは、種々のビアリアル誘導体を試験化合物として使用した。

第2組の試験化合物について、まず1 mMの濃度でスクリーニングにかけ、アフィニティーを示す試験化合物の結合定数を測定する。タンパク質に結合する最良のリガンドを機能アッセイで得た結果と比較する。適切なリガンドである上記化合物を化学的に修飾して、最終的には新規な薬物を発見することがで

きる類似化合物を製造する。

更に、本発明は、標的分子と該標的分子に結合するリガンド間の解離定数を測定する方法を提供する。この方法は、

- a) ^{15}N -標識標的分子の第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを発生させるステップ、
- b) 前記した標識標的分子を濃度の異なるリガンドで滴定するステップ、
- c) ステップb) の各濃度のリガンドで2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを発生させるステップ、
- d) ステップa) で発生させた第1スペクトルとステップc) で発生させた他のすべてのスペクトルを比較して、これらのスペクトルの違いをリガンド濃度の変化の関数として定量するステップ、及び
- e) その違いから、標的分子とリガンド間の解離定数 (K_D) を算出するステップを含む。

医化学での重要性から、上記方法で使用される好ましい標的分子はポリペプチ

ドである。1つの好ましい実施態様では、リガンドの解離定数を測定する方法は第2リガンドの存在下で実施され得る。この実施態様では、 ^{15}N -標識標的分子を、該

分子を試験化合物に作用させる前に第2リガンドに結合させる。

タンパク質の $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 化学シフトをリガンド濃度の関数として追跡することにより、結合または解離定数を測定する。既知濃度の標的分子 ($[P]_0$) を既に同定されている既知濃度のリガンド ($[L]_0$) と混合し、2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ 相関スペクトルを取得する。このスペクトルから、観察された化学シフト値 (δ_{obs}) を得る。リガンドの濃度を可能ならば標的分子の飽和点まで変化させるべく上記方法を繰り返す。飽和の時点で飽和の極限化学シフト値 (δ_{sat}) を測定する。

標的分子が飽和している場合には、特定リガントの標的分子に対する結合の解離定数は下記式により計算される。

$$K_D = \frac{([P]_0 - x)([L]_0 - x)}{x}$$

上記式中、 $[P]_0$ は標的分子の総モル濃度であり、 $[L]_0$ はリガンドの総モル濃度であり、 x は式

$$x = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{free}}}{\Delta}$$

(ここで、 δ_{free} は遊離種の化学シフトであり、 δ_{obs} は観察された化学シフト値であり、 Δ は飽和 (δ_{sat}) の場合の極

限化学シフト値とリガンドを含まない (δ_{free}) 標的分子の化学シフトの差である) に従って決まる。

次いで、解離定数を、測定データに対するベストフィットが標準の曲線当てはめ統計法を用いて得られるまでその値を変化させることにより測定する。 δ_{sat} が直接既知でない場合には、 K_D 及び δ_{sat} を変化させて同じ曲線当てはめ法にかける。

本発明の方法を、各種リガンドの各種標的分子に対する結合または解離アフィニティーを測定するために使用した例は、後記実施例2及び3に記載されている。

好ましい標的分子、スペクトルを発生させる手段及びスペクトルを比較する手段は上記と同じである。

設計方法の第1ステップでは、特定の標的分子に結合する2つまたはそれ以上のリガンドを同定する。そのようなリガンドの同定は、上記した2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR関連スペクトルを用いて実施する。

2つ以上のリガンドが別々のサイトで標的分子に結合すると同定されたなら、標的分子とリガンドとの複合体が形成される。リガンドが2つのとき、複合体は3元複合体である。リガンドが3つまたはそれ以上のときには、4元及び他の複合体が形成

される。

複合体は、リガンドが標的に結合し得る条件下で標的分子を各種リガンドと同時にまたは逐次に混合することにより形成される。上記条件を決定する方法は当業界で公知である。

複合体が形成されたら、その3次元構造を調べる。3次元構造を測定する任意の手段が使用される。そのような手段は公知であり、例えばNMR及びX線結晶学であり、これらの方法が好ましい。3次元の二重及び三重共鳴NMRをストロメライシンの触媒ドメインに結合した2つのリガンドの3次元構造を測定するために使用した例が、後記実施例4に詳細に記載されている。

3次元構造を分析すると、リガンドの他のリガンドに対する及び標的分子の配置に対する立体配向が分かる。まず、各リガンドの標的分子に対する立体配向から、結合に直接関与するリガンドの部分（例えば、標的結合サイトと相互作用する部分）を同定することができ、結合サイトから突出しており続く結合手順で使用され得る各リガンドの部分と同定することができる。

第2に、立体配向データを、各リガンドの他のリガンドに対する相対位置をマッピングするために使用される。言い換えれ

ば、空間的に配向されたリガンド間の離散距離を計算することができる。

第3に、立体配向データは、複数のリガンドと標的間の3次元関係をも規定する。すなわち、リガンド間の絶対距離を計算する他、これらのリガンドの角配向をも測定することができる。

リガンド及び標的の立体配向がわかれば、2つ以上のリガンドを結合してすべてのリガンドを含む単一物質とするリンカーを選択することができる。リンカーは、単一物質の各リガンド部分を標的に対して適切な配向で維持するために必要な距離及び角配向に基づいて設計される。

適当なリンカーの3次元構造は、当業者に公知であるかまたは容易に確認することができる。理論的には2つ以上のリガンドを任意の距離及び3次元投影で相互に結合させることが可能であるとしても、実際には距離及び投影にある制限を設けることが好ましい。好ましい実施態様では、リガンドは約15オングストローム(Å)未満、より好ましくは約10Å未満、更に好ましくは約5Å未満の距離離れている。

適当なリンカー基が同定されれば、リガンドをそのリンカーで結合させる。リガンドを結合させる手段は当業界で公知であ

り、リガンド及びリンカー基それ自体の化学構造に依存する。リガンドは、標的分子への結合に直接関与しないリガンドの部分を使用して互いに結合している。

本発明の方法を用いて設計された薬物であるストロメライシンの蛋白分解活性を阻害する薬物の設計の詳細については、後記実施例4に記載している。

下記実施例に本発明の好ましい実施態様を示すが、これら実施例は明細書及び請求の範囲を限定するものではない。

実施例 1

均一に¹⁵N-標識された標的分子の調製

A. ストロメライシン

ヒトストロメライシンは、軟骨のタンパク質分解に関与すると考えられている447アミノ酸のタンパク質である。軟骨がタンパク質分解すると、関節軟骨が分解損失し、骨関節症及びリウマチ様関節炎では関節機能の低下が見られる。こ

のタンパク質は、N-末端潜在の及びプロペプチドドメイン、ホモペキシニンに類似のC-末端ドメイン及び内部の触媒ドメインを含めた一連のドメインを有する。

研究で、約80個のアミノ酸のN-末端プロ配列を除去する

と、プロ酵素は45 kDa成熟酵素に変換されることが判明している。また、研究から、触媒ドメインを適切に折りたたむためにも阻害剤と相互作用するためにも、C-末端ホモペキシニン相同ドメインが必要でないことが判明している（例えば、A. I. Marcy, Biochemistry, 30:6476-6483 (1991) 参照）。そこで、ストロメライシンの81-256アミノ酸残基の内部セグメントを、ストロメライシンに結合し、ストロメライシンの阻害剤として作用する可能性のある化合物を同定するために使用されるタンパク質断片として選択した。

本発明の方法を使用するためには、ペプチド骨格が同位体的に¹⁵Nを多く含むストロメライシンの81-256断片（配列番号1）を調製する必要があった。このために、タンパク質断片の産生をコードするプラスミドを大腸菌株に挿入し、遺伝子工学的に修飾した細菌菌株を¹⁵NH₄Cl及び¹³C-グルコースに富む制限培地で増殖させた。

培地から同位体を多く含むタンパク質断片を単離し、精製した後試験化合物の結合を評価するための基礎として使用した。これらの方法の手順を以下に記載する。

ヒト皮膚繊維芽細胞（ATCC番号CRL 1507）を、Clarkら、Archiv. Biochem. and Biophys., 241:36-45 (1985)に記載されている手順を用いて、増殖し、誘導した。総RNAを、Promega RNAgents（登録商標）総RNA単離システムキット（カタログ番号Z5110、Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, マディソン, ウィスコンシン州 53711-5399）を用い、製造業者の指示に従って、1gの細胞から単離した。1μg

部分のRNAを80℃で5分間熱変性後、GeneAmp（登録商標）RNA PCRキット（カタログ番号N808-0017, Applied Biosystems/Perkin-Elmer, 761 Main Avenue, ノーウォーク, コネティカット州 06859-0156）を用い、製造業者の指示に従って、逆転写PCRにかけた。

入れ子 (nested) PCRを、第1プライマー (A)
GAAATGAAGAGTCTTCAA（配列番号3）及び (B)
GCGTCCCAGGTTCTGGAG（配列番号4）を用い、94℃×2分間、45℃×2分間
及び72℃×3分間の条件下で35サイクル施

して実施した。続いて、内部プライマー (C)
ATACCATGGCCTATCCATTGGATGGAGC（配列番号5）及び (D)
ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGAGTCAGG（配列番号6）を用い、すぐ上に記載したと
同じ条件下で30サイクル施して再増幅して、ヒストロメライシンのアミノ酸
残基1-256をコードするDNAを生じさせた。

次いで、PCR断片を、製造業者の指示に従ってPCRクローニングベクター
pT7ブルー (R) (Novagen, Inc., 597 Science Drive, マディソン, ウィスコンシン州 53711) にクローニングした。
生じたプラスミドをNcoI及びBamHIで切断し、ストロメライシン断片を
製造業者の指示に従ってNovagen発現ベクターpET3d (Novagen, Inc., 597 Science Drive, マディソン, ウィスコン
シン州 53711) にサブクローニングした。

アミノ酸残基81-256プラス開始メチオニンをコードする成熟ストロメラ
イシン発現構築物を、1-256発現構築物からPCR増幅法により調製した。
生じたPCR断片を、上記したように製造業者の指示に従って、まず Nova
gen

pT7Blue (R) ベクターにクローニングし、次いでNovagen pE
T3dベクターにサブクローニングして、プラスミド (pETST-83-25

6) を調製した。この最終プラスミドは、本プラスミドがヒトストロメライシンの配列の81番目の、より前の2つアミノ酸で始まるペプチド配列をコードする点を除いて、Qi-Zhuangら、Biochemistry, 31:11231-11235 (1992) に記載されているものと同一である。

プラスミドpETST-83-256を、製造業者の指示に従って大腸菌株BL21 (DE3) / pLysS (Novagen, Inc., 597 Science Drive, マディソン, ウィスコンシン州 53711) に形質転換して、発現株BL21 (DE3) / pLysS / pETST-255-1を得た。

予備培養培地を、脱イオン水150mlに $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.698g、 KH_2PO_4 0.45g、 NaCl 0.075g、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 0.150g、 ^3C -グルコース0.300g、1M- MgSO_4 水溶液300 μl 及び CaCl_2 水溶液15 μl を溶解して調製した。

こうして調製した予備培養培地の溶液を滅菌し、500ml容の滅菌バフルフラスコに移した。予備培養培地に細菌菌株を接種する直前に、100%エタノール中に34mg/mlのクロラムフェニコールを含む溶液150 μl 及び20mg/mlのアンピシリンを含む溶液1.5mlをフラスコ内容物に添加した。

次いで、遺伝的に修飾した大腸菌株BL21 (DE3) / pLysS / pETST-255-1のグリセロールストック1mlをフラスコ内容物に接種した。フラスコ内容物を、光学密度が0.65になるまで37℃で振とうした(225rpm)。

発酵栄養培地を、脱イオン水9604mlに $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 113.28g、 KH_2PO_4 30g、 NaCl 5g及び1% DF-60消泡剤10mlを溶解して調製した。この溶液をNew Brunswick Scientific Micros Fermenter (Edison, ニュージャージー州) に入れ、121℃で40分間滅菌した。

培養培地を接種する直前に、以下の成分、すなわち $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ の10%水溶液100ml、 ^{13}C -グルコースの10%水溶液100ml、1M- MgSO_4

水溶液20ml、1M-

CaCl₂水溶液1ml、チアミン塩酸塩(10mg/ml)の水溶液5ml、100%エタノール中に34mg/mlのクロラムフェニコールを含む溶液10ml及び前記クロラムフェニコール溶液に溶解させた1.9gのアンピシリンを、予め滅菌してから発酵容器内容物に添加した。得られた溶液のpHを4N-H₂SO₄水溶液を添加して7.00に調整した。

上記した振とうフラスコスケール法により調製した大腸菌株BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1の予備培養物を発酵槽内容物に添加し、光学密度が0.48になるまで細胞を増殖させた。この間、必要に応じて4N-H₂SO₄または4N-KOHを添加して発酵槽内容物のpHを自動的に7.0に維持した。発酵槽内容物の溶存酸素濃度を、その濃度が55%未満になると攪拌速度が速くなる縦続ループを用いて55%以上に維持した。空気を7標準リットル/分(SLPM)で発酵槽内容物に供給し、培養温度を処理中37℃に維持した。

細胞を4℃、17,000×gで10分間遠心することにより収集し、生じた細胞ペレットを集め-85℃で保存した。生細胞収量は3.5g/lであった。細胞溶菌液の可溶性及び不

溶性部分をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分析したところ、約50%の¹⁵N-ストロメライシンが可溶性相に認められた。

上記のようにして調製した同位体標識ストロメライシン断片を、Yeら、Biochemistry, 31:11231-11235(1992)に記載されている方法の変法を用いて精製した。

収集した細胞を、1mMのMgCl₂、0.5mMのZnCl₂、25単位/mlのBenzonase(登録商標)酵素、及び1μg/mlの4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニルフロリド("AEBSF")と1μg/mlのLeupeptin(登録商標)と1μg/mlのAprotinin(登録商

標)と $1\mu\text{g/ml}$ のPepstatin (登録商標)とからなる阻害剤混合物を含む 20mM のTris-HCl緩衝液(pH8.0)ナトリウムアジド溶液に懸濁させた。なお、AEBSF、Leupeptin (登録商標)、Aprotinin (登録商標)及びPepstatin (登録商標)は17 Strathmore Road、ナティック、マサチューセッツ州 01760に所在のAmerican Interna-

tional Chemicalから市販されている。

生じた混合物を1時間緩やかに攪拌してから、 4°C に冷却した。その後、細胞を50%の使用率(duty cycle)で音波破壊した。得られた溶菌液を $14,000\text{rpm}$ で30分間遠心し、不溶性分画のペレットを後続の処理(後記参照)のために -80°C で凍結した。

固体の硫酸アンモニウムを飽和の20%のポイントまで上清に添加し、生じた溶液を 700ml フェニルセファロース高速流動("Q-Sepharose FF")カラム(Pharmacia Biotech., 800 Centennial Ave., P. O. Box 1327, ピスカタウェー, ニュージャージー州 08855)に充填した。充填前に、セファロースカラムを 50mM -Tris-HCl緩衝液(4°C でpH7.6)、 5mM - CaCl_2 及び 1M -(NH_4) $_2\text{SO}_4$ で平衡化した。充填したカラムに直線勾配の(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 水溶液及びTris-HCl緩衝液(pH7.6)中の CaCl_2 水溶液を流して溶離させた。前記(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 水溶液の濃度は 1M から 0M に漸減させ、前記 CaCl_2 水溶液の濃度は 5mM から 20mM に漸増させた。

溶出液の活性分画をAmicon攪拌セル(Amicon, Inc., 72 Cherry Hill Drive, ビバリー, マサチューセッツ州 01915)に集め、濃縮した。濃縮したサンプルを、Q-Sepharose FFカラム、 10mM の CaCl_2 を含む 50mM のTris-HCl(4°C でpH8.2)を用いて最初の緩衝液中に一晩透析した。

次いで、透析したサンプルをQ-Sepharose FFカラムに充填し、

最初の緩衝液及び200 mM-NaClからなる直線勾配で溶離させた。同位体標識したストロメライシンの精製可溶性分画を濃縮し、4℃で保存した。

ペレットを8Mのグアニジン-HClに可溶化した。生じた溶液を20,000 rpmで20分間遠心し、上清を、50 mM-Tris-HCl (pH 7.6)、10 mM-CaCl₂、0.5 mM-ZnCl₂、及び1 µg/mlのAEBEFと1 µg/mlのLeupeptin (登録商標)と1 µg/mlのAprotinin (登録商標)と1 µg/mlのPepstatin (登録商標)とからなるフォールディング緩衝液中に滴下した。フォールディング緩衝液の容量は上清の容量の10倍とした。上清及びフォールディング緩衝液の混合物を

20,000 rpmで30分間遠心した。

上記遠心から得た上清を4℃で保存し、ペレットに上記したグアニジン-HCl中への可溶化、緩衝液中でのリフォールディング及び遠心のステップを2回施した。3回の遠心の各々から得られた最終上清を合わせ、20%飽和のポイントまで固体の硫酸アンモニウムを添加した。こうして不溶性分画から誘導された溶液を、固体分画について上記したようにフェニルセファローズ及びQ-セファローズを用いて精製した。

精製した可溶性及び不溶性分画を合わせて、元の細胞ペースト1 g当たり約1.8 mgの精製した同位体標識ストロメライシン81-256分画を得た。

B. ヒトパピローマウイルス (HPV) E2阻害剤

パピローマウイルスは、性器いぼ及び子宮頸癌を引き起こす小DNAウイルスの科である。HPVのE2タンパク質はウイルス転写を調節し、ウイルスの複製に必要とされている。従って、E2のDNAへの結合をブロックする分子はHPVに対する有用な治療剤となり得る。DNAではなくタンパク質を標的として選択したのは、より選択性の物質はDNAよりもむしろタンパク質に結合するだろうと予測されるからである。

ヒトパピローマウイルスE2のDNA-結合ドメインを、E2をコードする完全長DNAからPCR法を用いてクローニングし、T7発現系を用いて細菌にお

いて過剰発現させた。均一に¹⁵N-標識されたタンパク質を、¹⁵N-標識塩化アンモニウムを含有する最少培地で増殖させた細菌から単離した。このタンパク質を、緩衝液(50 mM-TRIS、100 mM-NaCl、1 mM-EDTA、pH=8.3)で予め平衡化したセファロース高速流動カラムを用いて細菌細胞溶菌液から精製した。

タンパク質を、緩衝液中100→500 mMのNaClの直線勾配で溶離し、プールし、pH 7.0でMono-Sカラムにかけた。タンパク質を塩勾配(100→500 mM)で溶離し、0.3 mMまで濃縮し、アジ化ナトリウム(0.5%)を含むTRIS緩衝(50 mM、pH=7.0) H₂O/D₂O (9/1)溶液に交換した。

C. RAF

RAFタンパク質の均一に¹⁵N-標識したRas結合ドメインを、Emersonら、Biochemistry, 34(21):6911-6918(1995)に記載されている

ように調製した。

D. FKBP

均一に¹⁵N-標識した組換えヒトFK結合タンパク質(FKBP)を、Loganら、J. Mol. Biol., 236:637-648(1994)に記載されているように調製した。

実施例 2

2次元¹⁵N/¹H NMR相関スペクトル分析を用いる化合物のスクリーニング

ストロメライシンの触媒ドメインを実施例1の手順に従って調製した。スクリーニングアッセイで使したタンパク質溶液は、TRIS緩衝(50 mM、pH=7.0) H₂O/D₂O (9/1)溶液中にストロメライシンの均一に¹⁵N-標識した触媒ドメイン(0.3 mM)、アセトヒドロキサム酸(500 mM)、CaCl₂(20 mM)、及びアジ化ナトリウム(0.5%)を含むものであった。

2次元¹⁵N/¹H NMR相関スペクトルを、三重共鳴プローブ及びBrukerサンプル充填機を備えたBruker AMX500 NMR分光光度計を

用いて29℃で発生させた。 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQCスペクトルを、掃引幅2000 Hz

(^{15}N , t_1) 及び8333 Hz (^1H , t_2) を用いて80×1024複合点として得た。データは、スキャン間の遅延を1秒とし、自由誘導減衰 (fid) 当たり8スキャンとして収集した。すべてのNMRスペクトルをSilicon Graphics コンピューターでインハウスで作成されたソフトウェアを用いて処理し、分析した。

上記した ^{15}N -標識ストロメライシン標的分子について第1の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -NMR 相関スペクトルを得た。ついで、ストロメライシン標的を試験化合物のデータベースに作用させた。化合物のストック溶液を100 mM及び1 Mで調製した。また、1サンプル当たり8～10種の化合物を各化合物を100 mMの濃度で含む組み合わせライブラリーも作成した。

100 mMリン酸緩衝溶液 (pH=7.0) で1/10倍希釈してもpH変化が生じないように、1 Mストック溶液のpHを酢酸及びエタノールアミンで調節した。pHの調節は重要である。なぜならば、pHがわずかにでも変化すると生体分子の化学シフトが変化し、NMRデータの解釈を難しくする可能性があるからである。

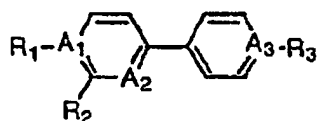
データベース中の化合物をサイズ (分子量=100～300)

及び分子の違いに基づいて選択した。広範囲にわたる結合サイトと相互作用する化合物を発見する可能性を最大現とするためには、コレクション中の分子は様々な形態 (例えば、フラットな芳香族環、皺がよった脂肪族環、一重、二重もしくは三重結合を有する直鎖及び分枝鎖脂肪族化合物) 及び様々な官能基 (例えばカルボン酸、エステル、エーテル、アミン、アルデヒド、ケトン及び各種複素環) を持っていた。

NMRサンプルは、各化合物を100 mMの濃度で含む化合物混合物のDMSOストック溶液4 μl を均一に ^{15}N -標識したタンパク質の $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1) 緩衝溶液0.4 ml に添加することにより調製した。NMRサンプル中の各

化合物の最終濃度は約1 mMであった。

第1回のスクリーニングにおいて、ストロメライシンの触媒ドメインに結合する2つの化合物を見つけた。これらの化合物は両方ともビアリール部分を含む。こうした第1回目の最初のヒットに基づいて、複数の構造的に類似の化合物をストロメライシンに対してテストした。ビアリール化合物の構造は以下の構造式Iにより表される。



$R_1 \sim R_3$ 及び $A_1 \sim A_3$ の定義については表1を参照されたい。

第2回のスクリーニングにおいて、アセトヒドロキサム酸の飽和量(500 mM)の存在下または非存在下での結合を調べた。

多くのビアリール化合物がストロメライシンの触媒ドメインに結合することが判明した。図4に、ストロメライシンにビアリール試験化合物を作用させる前及びその後の代表的な2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR 相関スペクトルを示す。図4から明らかなように、化合物はW124、T187、A199及びG204と命名したサイトのような ^{15}N -サイトに化学シフトを生じさせた。

これらのサイトは、配列番号1の124位のトリプトファン(Trp)残基、187位のトレオニン(Thr)残基、199位のアラニン(Ala)残基及び204位のグリシン(Gly)残基に対応する。図9は、NMR結合データとストロメライシンの触媒ドメインのNMR誘導3次元構造の図の相関関係を示す。特定リガンドの特定結合サイトを位置決定できることは本

発明の利点である。

数種の化合物のみがヒドロキサム酸の存在下でストロメライシンに結合した。従って、数種の化合物の結合アフィニティーがヒドロキサム酸の存在下で増強された(すなわち、協同的である)。これらの結果は、他の分子の存在下でタンパク質に結合する化合物を同定できるという本発明のスクリーニングアッセイの別

の重要な可能性を例示している。

構造 I を有する各種ビアリール化合物を、異なる濃度でストロメライシンへの結合について試験した。各濃度で発生した¹⁵N/¹Hスペクトルを評価し、スペクトルの違いを化合物濃度の関数として定量した。これらの違いから、結合または解離定数(K_D)を当業界で公知の標準的な方法に従って算出した。これらの試験の結果を表 1 に示す。表 1 中の $R_1 \sim R_3$ 及び $A_1 \sim A_3$ の位置は上記構造式 I を参照されたい。

表 1

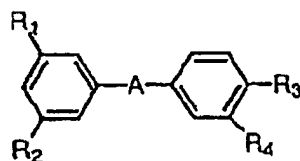
化合物 No.	R_1	R_2	R_3	A_1	A_2	A_3	$K_D(\text{mM})$
1	H	OH	H	C	C	C	1.1
2	CH ₂ OH	H	H	C	C	C	3.2
3	Br	H	OH	C	C	C	1.3
4	H	H	H	N	N	C	1.6
5	CHO	H	H	C	C	C	1.7
6	OCH ₃	NH ₂	H	C	C	C	0.4
7	H	H	H	N	C	C	0.2
8	OCOCH ₃	H	H	C	C	C	0.3
9	OH	H	OH	C	C	C	0.16
10	H	H	H	N	C	N	0.4
11	OH	H	H	C	C	C	0.3
12	OH	H	CN	C	C	C	0.02

表 1 のデータから、本発明の方法がリガンドと標的分子間の解離または結合定数を測定するために使用されることが分かる。

本発明のNMRスクリーニングアッセイの別の利点は、2次元¹⁵N/¹H NMR 相関スペクトルにおいて観察された化学シフトを標的分子配置の他のスペクトルまたは投影と相関させ得ることである。そのような相関の代表的な結果を図 9 に示す。図 9 には基質分子との結合が最も確実に起こるであろうポリペプチドの領域が示されている。この図では、ストロメライシン

における(表1の)化合物1に対する見かけ結合領域が示されている。

E2タンパク質のDNA-結合ドメインへの結合について、データベースからの化合物を同様にスクリーニングした。試験した化合物は以下の構造式IIを有するものであった。



R₁~R₄及びAの定義については表2を参照されたい。

NMR実験は、三重共鳴プローブ及びBrukerサンプル充填機を備えたBruker AMX500 NMR分光光度計を用いて29℃で実施した。¹⁵N/¹H HSQCスペクトルを、掃引幅2000Hz (¹⁵N, t1)及び8333Hz (¹H, t2)を用いて80×1024複合点として得た。データは、スキャン間の遅延を1秒とし、自由誘導減衰(fid)当たり4スキャンとして収集した。すべてのNMRスペクトルをSilicon Graphicsコンピューターで処理し、分析した。

図2及び図3はそれぞれ、E2のDNA結合ドメインを第1

及び第2の試験化合物に作用させる前及び後の代表的な2次元¹⁵N/¹H NMR関連スペクトルを示す。

図2から明らかなように、第1の化合物はI15、Y21、R22及びL23と命名されるサイトのような¹⁵N-サイトに化学シフトを生じさせた。これらのサイトは、配列番号6の15位のイソロイシン(Ile)残基、21位のチロシン(Tyr)残基、22位のアルギニン(Arg)残基及び23位のロイシン(Leu)残基に相当する。

図3から明らかなように、第2の化合物はI6、G11、H38及びT52と命名される特定の¹⁵N-サイトに化学シフトを生じさせた。これらのサイトは、配列番号6の6位のイソロイシン(Ile)残基、11位のグリシン(Gly)残基、38位のヒスチジン(His)残基及び52位のトレオニン(Thr)残

基に相当する。

図7及び図8は、上記したNMTR結合データとE2のDNA-結合ドメインのNMR誘導3次元構造の図との相関関係を示す。

数種の構造的に類似の化合物は、1 mMの濃度でスクリーニングしたときタンパク質の化学シフトの変化を生じさせた。化

合物の添加時に2組の明確なアミド共鳴が変化することが見られた。1組のシグナルは2つのモノマー間に形成される β -バレル中に位置するアミドに相当し、他組のシグナルはDNA結合サイトの近くに位置するアミドに相当する。

例えば、2個のフェニル環を有し、該環を連結する炭素に結合したカルボン酸を有する化合物のみが、DNA結合サイトのアミドの化学シフトを変化させた。対照的に、ベンゾフェノン及びフェノキシフェニル含有化合物のみが β -バレル (barrel) に結合した。他の化合物では両組のシグナルの化学シフトの変化を生じさせたが、量を変えることにより各組のシグナルはシフトされた。このことから、2つの明確な結合サイトの存在が示唆される。

リガンド濃度の関数として化学シフトの変化をモニターすることにより、2つの結合サイトに対する結合定数をも測定した。これらの試験結果を下記表2にまとめて示す。

表 2

化合物 No.	A	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	DNA K _D (mM)	β-バレル K _D (mM)	フィルター 結合アッセイ
13	CO	H	H	H	OH	>50	0.6	-
14	O	H	H	H	CH ₂ OH	>50	2.0	-
15	-a	H	H	COO	H	2.0	>50	+
16	-a	Cl	Cl	COO	H	0.1	>50	+
17	-a	H	H	CH ₂ COO	H	4.2	4.9	+
18	-a	H	H	CH=CHCOO	H	1.2	6.2	+
19	O	H	H	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) -CH ₂ COO	H	0.5	0.2	+
20	O	H	H	COCH ₂ CH ₂ COO	H	2.7	4.8	+

注：A欄の“-a”は原子が存在しないこと、すなわちビフェニル結合を示す。

RAFタンパク質の均一に¹⁵N-標識したRas結合ドメインを実施例1に記載されているように調製し、上記したNMR手順に従って2次元¹⁵N/¹H NMR相関スペクトル分析を用いてスクリーニングした。代表的な試験結果を図5に示す。図5には、試験化合物を作用させる前及びその後の2次元¹⁵N/¹H NMR相関スペクトルを示す。

均一に¹⁵N-標識したFKBPを実施例1に記載されているように調製し、上記したNMR手順に従って2次元¹⁵N/¹H

NMR相関スペクトル分析を用いてスクリーニングした。代表的な試験結果を図6に示す。図6には、試験化合物に作用させる前及びその後の2次元¹⁵N/¹H NMR相関スペクトルを示す。

実施例3

NMR、酵素、フィルター結合及びゲルシフトスクリーニングアッセイの比較

本発明のNMR法により測定したリガントの各種生体分子に対する結合定数を、複数の従来方法で得た結果と比較するために試験を実施した。

第1の試験では、本発明のNMR法及び従来の酵素アッセイにより結合定数を

測定した。標的分子は、実施例1の手順に従って調製したストロメライシンの触媒ドメインであった。NMR結合定数 K_D は、実施例2に記載の2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR相関スペクトルを用いて得た。こうして得た K_D 値を、酵素アッセイで測定した阻害定数 K_i と比較した。

酵素アッセイでは、発蛍光団とクエンチング剤の分離を引き起こすペプチド分解時の蛍光増加を追跡することにより蛍光基質の分解速度を測定した。酵素活性を、各種濃度のアセトヒド

ロキサム酸とビアリール化合物のマトリックスを用いて測定した。アッセイは、Matayoshiら、Science: 247: 954-958 (1990) に記載の蛍光基質特性を使用し、H. Weingartenら、Anal. Biochem., 147: 437-440 (1985) に記載の方法の改変である。

アセトヒドロキサム酸の濃度を0.0~1.0Mの範囲で8段階で変え、化合物の濃度を6段階で変え、全体で48点で試験した。各化合物の濃度は溶解性及び活性により変化させた。

アセトヒドロキサム酸それ自体を滴定することを除いて、すべてのNMR測定を500mMのアセトヒドロキサム酸の存在下で実施した。化学シフトが添加したリガントに応じて変化することが観察されたことから、解離定数を求めた。次いで、標準的な手順に従って阻害データから阻害定数を求めた。

これらの試験結果を下記表3にまとめて示す。この表には、NMR誘導解離定数(K_D)と蛍光基質を用いる酵素アッセイで測定した阻害定数(K_i)とを比較して示す。

表 3

化合物 No.	N M R K_D (m M)	アッセイ K_I (m M)
4	1 . 6	7 . 4
7	0 . 1 7	0 . 3 2
9	0 . 1 6	0 . 7 0
1 0	0 . 4 0	1 . 8
1 2	0 . 0 2	0 . 1 1
アセトヒドロキサム酸	1 7 . 0	2 1 . 1

表3のデータから、本発明のNMR法はリガンドの標的生体分子に対する解離または結合定数の迅速、効率的且つ正確な測定方法を提供することが分かる。2つの方法で測定した結合定数の比較から、試験した化合物の活性が同じランクに位置づけられる。すなわち、2つの方法で測定した所与の基質に対する値は同一ではないが、これらの値は相互に比例している。

第2の実験で、E2のDNA-結合ドメインのその標的DNAに対する結合結果を従来方法で得、本発明の方法で得た結果と比較した。標的は、実施例1の手順に従って調製したE2のDNA-結合ドメインであった。NMRスクリーニングアッセイ及びリガンド解離定数を測定するためのNMR法は実施例2に記載のように実施した。

NMR法による結合定数を、DNAの標的への結合を測定する物理的フィルター結合アッセイの結果と比較した。高処理量フィルター結合アッセイは、上記実施例2に従って調製したE2を用いて実施した。³³ P-標識DNAは、3個の高アフィニティーE2結合サイト及び1つの低アフィニティーE2結合サイトを含むHPV-11ゲノムをPSP-65プラスミド (Promega, マディソン, ウィスコンシン州) に挿入して形成した10,329塩基対プラスミドからなるものであった。

複数の化合物について、NMRで測定した異なるサイトの結合アフィニティーをフィルター結合アッセイで測定したE2のDNAへの結合の抑制と比較した。

上記した表2から明らかなように、フィルター結合アッセイで測定した活性は、DNA結合サイトのアミドから求めた結合アフィニティーと密接に相關するが、 β -バレルサイトで測定したアフィニティーとは相關しなかった。これは、各サイトの相対位置に一致する。

別の試験では、NMRで測定した結合の結果は、当業界で公知の方法を用いる従来のゲルシフトアッセイで得た結果と類似していた。ゲルシフトアッセイは、完全長E2と2つのE

2結合サイトを含む³³P-標識62塩基対DNA断片とを含むGST融合タンパク質を用いて実施した。

上記方法により、ゲルシフトアッセイで正の結果を示した多数の化合物を同定した。しかしながら、正の結果の幾つかはDNAに結合することに起因するものと考えられた。何故ならば、この場合、本発明のNMR法を用いるとE2タンパク質への結合は認められなかったからである。化合物を添加したときタンパク質よりもDNAの化学シフトが変化することが立証されているように、上記化合物は実際にはE2よりもむしろDNAに結合することが分かった。これらのデータから、本発明の更に別の利点が偽陽性の発現率を最小にし得ることであるが分かる。

実施例4

ストロメライシンの強力な非ペプチド阻害剤の設計

ストロメライシンの触媒ドメインに結合する新規リガンドを設計するために試験を実施した。ストロメライシンは自己分解されるので、ストロメライシンの分解をブロックする阻害剤を探した。そのような阻害剤を用いれば、酵素の他のサイトに結合する他の強力なリガンドを容易にスクリーニングできるであ

ろう。

他の結合サイトをスクリーニングする際に化合物を選択するとき用いられる基準は、主にリガンドのサイズに基づいた。飽和（酵素の>98%占有率）するに十分な溶解度を有し酵素を阻害する最小のリガンドを探した。

ストロメライシンの触媒ドメインのクローニング、発現及び精製を実施例1に記載した手順を用いて実施した。新規リガントを設計する場合の第1ステップは、ストロメライシン標的に結合した第1リガントを同定することであった。その同定は、上記した2次元 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR関連スクリーニング法に従って実施した。

一般式 $\text{R}-(\text{CO})\text{NHOH}$ を有する多数のヒドロキサム酸を、実施例2に記載の手順を用いてストロメライシンへの結合についてスクリーニングした。試験した化合物のうち、アセトヒドロキサム酸 $[\text{CH}_3(\text{CO})\text{NHOH}]$ が選択基準に最もよく適合した。この化合物は17 mMというストロメライシンに対する結合アフィニティーを示し、良好な水溶性を示した。500 mMの濃度で、アセトヒドロキサム酸は酵素の分解を抑制し、他の有力なリガンドのスクリーニングに使用し得る。

設計方法の第2ステップは、アセトヒドロキサム酸の結合サイトとは異なるサイトで標的ストロメライシンに結合する第2のリガントを同定することであった。このために、飽和量のアセトヒドロキサム酸の存在下でストロメライシンに結合する能力について複数の化合物をスクリーニングした。この第2同定ステップの手順の詳細及び結果は実施例2に記載した通りである。

これらの試験から第2リガンドとして同定された化合物は表1の化合物No. 4であり（実施例2参照）、この化合物を次の設計ステップで使用した。

設計方法の第3ステップでは、標的ストロメライシン、第1リガント及び第2リガンドの3元複合体を構築した。このために、ストロメライシン標的を複合体を形成し得る条件で2つのリガントに作用させた。次いで、3元複合体の3次元構造を下記のNMR分光分析法を用いて調べた。

3元複合体中のストロメライシンの ^1H 、 ^{13}C 及び ^{15}N 骨格共鳴を、複数の3次元二重及び三重共鳴NMRスペクトルを分析して帰属させた（A. Baxら、Acc. Chem. Res., 26:131-138 (1993)）。隣接スピ
ン

系の ^1H 共鳴を、それぞれ $F1$ (^1H)、 $F2$ (^{13}C) 及び $F3$ (^1H) の各ディメンジョンにおいて 1773Hz (35.0ppm)、 3788Hz (30.1ppm) 及び 8333Hz (16.67ppm) の同一スペクトル幅で記録した3次元(3D) HNCAスペクトル(L. Kayら、J. Magn. Reson., 89:496-514 (1990)) 及びHN(CO)CA(A. Baxら、J. Biol. NMR, 1:99 (1991) スペクトルの分析から同定した。

データマトリックスは、HNCAスペクトルの場合には $38(t_1) \times 48(t_2) \times 1024(t_3)$ 複合点であり、HN(CO)CAスペクトルの場合には $32(t_1) \times 40(t_2) \times 1024(t_3)$ 複合点であった。両方のスペクトルを16スキャン/インクレメントで取得した。3次元CBCA(CO)NHスペクトル(S. Grzesiekら、J. Am. Chem. Soc., 114:6261-6293 (1992)) を、 $32(t_1, ^{15}\text{N}) \times 48(t_2, ^{13}\text{C}) \times 1024(t_3, ^1\text{H})$ 複合点及び32スキャン/インクレメントで集めた。スペクトル幅は、 ^{15}N 、 ^{13}C 及び ^1H の各ディメンジョンで 1773Hz (35.0ppm)、 7575.8Hz (60.2

ppm) 及び 8333Hz (16.67ppm) であった。

3つのスペクトルすべてについて、 ^1H キャリア周波数は水の共鳴に設定し、 ^{15}N キャリア周波数は 119.1ppm に設定した。 ^{13}C キャリア周波数は、HNCA及びHN(CO)CA実験の場合には 55.0ppm 、CBCA(CO)NH実験の場合には 46.0ppm に設定した。

骨格の帰属を、 ^{15}N -分離3次元NOESY-HSQCスペクトル及び3次元HNHA-Jスペクトルで観察された交差ピークの分析により確認した。 ^{15}N -分離3次元NOESY-HSQCスペクトル(S. Fesikら、J. Magn. Reson., 87:588-593 (1988)、D. Marionら、J. Am. Chem. Soc., 111:1515-1517 (1989)) は、 80ms のスピンロック時間(mixing time)で集めた。16スキャン/インクレメントで全部で $68(t_1, ^{15}\text{N}) \times 96(t_2, ^1\text{H}) \times 1024$

(t_3 , ^1H) 複合点を集め、スペクトル幅は、 ^{15}N ディメンジョンに対しては1773 Hz (35.0 ppm)、 ^1H ディメンジョンに対しては6666.6 Hz (t_2 , ^1H , 13.3 ppm) 及び8333 Hz (16.7 ppm) であつた。

た。

$^3\text{JHN}\alpha$ カップリング定数を得るためにも使用された3次元HNHA-Jスペクトル (G. Vuisterら、J. Am. Chem. Soc., 115: 7772-7777 (1993)) を、35 (t_1 , ^{15}N) \times 64 (t_2 , ^1H) \times 1024 (t_3 , ^1H) 複合点及び32スキャン/インクレメントで取得した。スペクトル幅及びキャリア周波数は、 ^{15}N -分離NOESY-HSQCスペクトルと同一であった。幾つかの H^β シグナルをHNHB実験により帰属させた。掃引幅は、32 (t_1 , ^{15}N) \times 96 (t_2 , ^1H) \times 1024 (t_3 , ^1H) 複合点で取得した ^{15}N -分離NOESY-HSQCスペクトルの場合と同一であった。

^1H 及び ^{13}C 化学シフトを、殆どすべての側鎖共鳴に対して帰属させた。3次元HCCH-TOCSYスペクトル (L. Kayら、J. Magn. Reson., 101b: 333-337 (1993)) を、 ^{13}C 同位体スピンロックの場合にはDIPSI-2シーケンス (S. Ruckerら、Mol. Phys., 68: 509 (1989)) を用いて13msのスピンロック時間で取得した。全部で96 (t_1 , ^{13}C) \times

96 (t_2 , ^1H) \times 1024 (t_3 , ^1H) 複合データ点を、10638 Hz (70.8 ppm, w1)、4000 Hz (6.67 ppm, w2) 及び4844 Hz (8.07 ppm, w3) のスペクトル幅を用いて16スキャン/インクレメントで集めた。キャリア位置は、40 ppm、2.5 ppm、並びに ^{13}C 、間接的に検出される ^1H 及び測定される ^1H の各ディメンジョンに対する水の周波数であった。

別の3次元HCCH-TOCSY実験を、122.5 ppmで ^{13}C -キャリアを用いて実施し、芳香族残基を帰属させた。スペクトルを、5263 Hz (35.0 ppm, w1)、3180 Hz (5.30 ppm, w2) 及び10,000

Hz (16.7 ppm, w3) のスペクトル幅を用いて、 $36 (t_1, {}^{13}\text{C}) \times 48 (t_2, {}^1\text{H}) \times 1024 (t_3, {}^1\text{H})$ 複合点で得た。キャリア位置は、122.5 ppm、7.5 ppm、並びに ${}^{13}\text{C}$ 、間接的に検出される ${}^1\text{H}$ 及び測定される ${}^1\text{H}$ の各ディメンジョンに対する水周波数であった。

${}^{13}\text{C}$ —分離3次元NOESY—HMQCスペクトル (S. Fesikら、J. Magn. Reson., 87:588-593 (1988)、D. Marionら、J. Am. Chem.

m. Soc., 111:1515-1517 (1989)) を、75msのスピンロック時間で記録した。16スキャン/インクレメントで全部で $80 (t_1, {}^{13}\text{C}) \times 72 (t_2, {}^1\text{H}) \times 1024 (t_3, {}^1\text{H})$ 複合データ点を、10638 Hz (70.49 ppm, w1)、6666.6 Hz (13.3 ppm, w2) 及び8333.3 Hz (16.67 ppm, w3) のスペクトル幅に亘って集めた。 ${}^1\text{H}$ キャリア周波数を水の共鳴に設定し、 ${}^{13}\text{C}$ キャリア周波数を40.0 ppmとした。

バリン残基及びロイシン残基のメチル基の立体特異的帰属を、断片的に ${}^{13}\text{C}$ —標識したタンパク質サンプルの高分解 ${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$ —HSQCスペクトル (G. Bodenhausenら、J. Chem. Phys. Lett., 69:185-189 (1980)) において観察された ${}^{13}\text{C}$ — ${}^{13}\text{C}$ —重結合カップリングパターンに基づく生合成法 (Neriら、Biochem., 28:7510-7516 (1989)) により得た。スペクトルを、 $200 ({}^{13}\text{C}, t_1) \times 2048 ({}^1\text{H}, t_2)$ 複合点で5000 Hz (39.8 ppm, ${}^{13}\text{C}$) 及び8333 Hz (16.67 ppm, ${}^1\text{H}$) のスペクトル幅に亘って取得した。キャリア位置は、 ${}^{13}\text{C}$ ディメンジョンに対しては20.0

ppm、 ${}^1\text{H}$ ディメンジョンに対しては水の周波数であった。

2つのリガンドとタンパク質間のNOEを検出するために、3次元の ${}^{12}\text{C}$ —濾過、 ${}^{13}\text{C}$ —編集NOESYスペクトルを集めた。パルススキームは、NOESY—HMQCシーケンス (S. Fesikら、J. Magn. Reson., 8

7:588-593 (1988)、D. Marionら、J. Am. Chem. Soc., 111:1515-1517 (1989)) と連結した、2重¹³C-濾過配列からなる (A. Gemmekerら、J. Magn. Reson., 96:199-204 (1992))。スペクトルを80msのスピンロック時間、1インクレメント当たり16スキャンでもって80(t_1 , ¹³C) × 80(t_2 , ¹H) × 1024(t_3 , ¹H) 全複合点で記録した。スペクトル幅は8865Hz (17.73ppm, w1)、6667Hz (13.33ppm, w2) 及び8333Hz (16.67ppm, w3) であり、炭素ディメンジョンに対するキャリア位置は40.0ppmであり、両プロトンディメンジョンに対するキャリア位置は水の周波数であった。

溶媒とゆっくり交換するアミド基を同定するために、一連の¹H, ¹⁵N-HSQCスペクトル (G. Bodebhausen

ら、J. Chem. Phys. Lett., 68:185-189 (1980)) を、タンパク質をD₂Oに交換した後25℃で2時間間隔で記録した。D₂Oを添加してから2時間後から、第1のFSQCスペクトルの取得を開始した。

すべてのNMRスペクトルをBruker AMX500またはAMX600 NMR分光光度計を用いて25℃で記録した。NMRデータをSilicon Graphicsコンピューターを用いて処理し、分析した。すべてのNMR実験で、適宜記載 (A. Baxら、J. Magn. Reson., 99:638 (1992)) されているようにパルス場勾配 (pulsed field gradient) を与え、溶媒シグナル及び人工的なスペクトル結果を抑制した。間接的に検出されたディメンジョンの定積分検出を、States-TPPI法 (D. Marionら、J. Am. Chem. Soc., 111:1515-1517 (1989)) を用いて実施した。記載 (E. Olejniczakら、J. Magn. Reson., 87:628-632 (1990)) されている直線予測法を使用した。

次いで、3元複合体の誘導された3次元構造を用いて、第1

及び第2のリガンドの一方のリガンドに対する及び標的ストロメライシン分子に対する立体配向を規定した。

NOEデータから誘導される距離抑制 (distancerestrains) を、下限を1.8 Å及び上限をそれぞれ2.5 Å、3.0 Å、3.5 Å、4.0 Å、4.5 Å及び5.0 Åとして、NOE交差ピーク強度に基づいて6カテゴリーに分類した。 ϕ ねじれ角に対する抑制を、3次元HNHA-Jスペクトル (G. Vuisterら、J. Am. Chem. Soc., 115:7772-7777 (1993)) から測定した $^3J_{NH\alpha}$ 結合定数から誘導した。 ϕ 角度は、 $^3J_{HNH\alpha} > 8.5 \text{ Hz}$ の場合には120%±40%に、 $^3J_{NH\alpha} > 5 \text{ Hz}$ の場合には60%±40%に抑制された。

当初の構造に基づいてアミドをゆっくり交換するために同定される水素結合は、2つの抑制、すなわちH-O距離の場合には1.8~2.5 Å及びN-O距離の場合には1.8~3.3 Åにより規定された。構造を、Silicon Graphicsコンピューターにより、X-PLOR3.1プログラム(A.

Brünger, "XPLOR3.1マニュアル", Yale University Press, New Haven,

1992)で、ハイブリッド距離幾何学-模擬アニーリング法 (M. Nilgesら、FEBS Lett., 229:317-324 (1988)) を用いて計算した。

全体で1032個の推定プロトン間距離抑制をNOEデータから誘導した。更に、21個の不明瞭な分子間距離抑制を3次元 ^{12}C 濾過、 ^{13}C -編集NOESYスペクトルから誘導した。タンパク質を含めた1032個のNOE抑制のうち、341は残基間であり、410は主要配列中の5個未満のアミノ酸により分離される残基間の逐次またはショートレンジであり、281は少なくとも5個のアミノ酸で分離される残基を含むロングレンジであった。

NOE距離抑制に加えて、14個の ϕ 二面角抑制が、HNHA-Jスペクトル (G. Vuisterら、J. Am. Chem. Soc., 115:7772-7777 (1993)) から求めた3つの結合カップリング定数 ($^3J_{HNH}$

α) から誘導された構造計算中に含まれた。実験的抑制は、60個の水素結合に相当する120個の距離抑制を含んでいた。水素結合に関与するアミドは、特徴的な遅い交換速度及び水素結合の抑制なしに計算された最初のNMRスペクトルからの水素結合の相手に

基づいて同定された。非冗長な実験的に誘導される抑制の総数は1166であった。

構造は、NMR実験的抑制とうまく一致した。0.4 Å以上の距離侵害も5度以上の二面角侵害もなかった。また、ファンデルワールス反発力の偽装エネルギーは小さく、このことから構造は誤った原子間作用を欠いていた。

対応する理想化パラメーターらの結合一長さ及び結合一角度のずれが小さいことが示すように、NMR構造は良好な共役結合幾何学的構造を示した。残基93～247の8つの構造の、平均座標からの平均の原子2乗平均偏差は、骨格原子(C^α , N及び C')の場合0.93 Åであり、非水素原子の場合はすべて1.43 Åであった。

ストロメライシン、アセトヒドロキサム酸(第1リガンド)及び第2リガンドを含む3元複合体のリボンプロットを図10に示す。構造は、他のマトリックスメタロプロテインナーゼの全ホールドと非常に類似しており、5-ストランド β -シート及び3個の α -ヘリックスから構成されている。

触媒亜鉛は結合ポケット中に位置していた。亜鉛は3つのヒスチジンとアセトヒドロキサム酸の2つの酸素原子と配位して

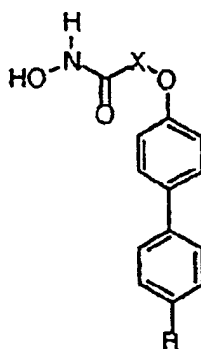
いた。第2リガンドのビアリール基は、第2ヘリックスと残基218～223から形成されるループとの間のS1'ポケット中に位置していた。この深く且つ狭いポケットには、リガンドとうまく作用させる疎水性残基がライニングされていた。

上記したように調べた3元複合体の3次元構造及びストロメライシンに対する、第2リガンドに構造的に類似している化合物(すなわち、他のビアリール化合物)の結合について測定した構造/活性の関係に基づいて、アセトヒドロキサム

酸をビアリールに結合させる新規分子を設計した。

以下の表4に示すように、選択した当初のビアリール類は酸素リンカーを含み、ビアリール結合に対してパラ位にCNを任意に存在するものであった。最初のリンカーは、長さの異なるメチレン単位を含んでいた。長さの異なるメチレン単位を有するリンカーを用いて化合物を結合させる方法は当業界で公知である。

表 4



化合物	X	R	ストロメライシン抑制
21	(CH ₂) ₂	H	0.31 μ M
22	(CH ₂) ₃	H	110 μ M
23	(CH ₂) ₄	H	38% @ 100 μ M
24	(CH ₂) ₅	H	43% @ 100 μ M
25	(CH ₂) ₂	CN	0.025 μ M
26	(CH ₂) ₃	CN	3.4 μ M
27	(CH ₂) ₄	CN	3.5 μ M
28	(CH ₂) ₅	CN	1.7 μ M

CN置換ビアリールがストロメライシンに対してうまく結合することから予測されるように、CN誘導体は良好なストロメライシン抑制を示した。ストロメライシンを最高に抑制した化合物は、2つのメチレン単位を含むリンカーを含んでいた。

本発明を好ましい実施態様を参照しながら説明してきた。こ

れらの実施態様により、請求の範囲及び明細書を限定されない。当業者ならば、本発明の範囲及び思想を逸脱しない範囲で上記実施態様に変化、変更及び修正を容易に加えることができる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：174

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Phe Arg Thr Phe Pro Gly Ile Pro Lys Trp Arg Lys Thr
 1 5 10
 His Leu Thr Tyr Arg Ile Val Asn Tyr Thr Pro Asp Leu
 15 20 25
 Pro Lys Asp Ala Val Asp Ser Ala Val Glu Lys Ala Leu
 30 35
 Lys Val Trp Glu Glu Val Thr Pro Leu Thr Phe Ser Arg
 40 45 50
 Leu Tyr Glu Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Ser Phe
 55 60
 Ala Val Arg Glu His Gly Asp Phe Tyr Pro Phe Asp Gly
 65 70 75
 Pro Gly Asn Val Leu Ala His Ala Tyr Ala Pro Gly Pro
 80 85 90
 Gly Ile Asn Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Gln
 95 100
 Trp Thr Lys Asp Thr Thr Gly Thr Asn Leu Phe Leu Val
 105 110 115
 Ala Ala His Glu Ile Gly His Ser Leu Gly Leu Phe
 120 125
 His Ser Ala Asn Thr Glu Ala Leu Met Tyr Pro Leu Tyr
 130 135 140
 His Ser Leu Thr Asp Leu Thr Arg Phe Arg Leu Ser Gln
 145 150
 Asp Asp Ile Asn Gly Ile Gln Ser Leu Tyr Gly Pro Pro
 155 160 165
 Pro Asp Ser Pro Glu Thr Pro
 170

配列番号 : 2

配列の長さ : 83

配列の型 : アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```

Met Ala Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Ala
                    5                      10
Asn Ile Leu Leu Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Ser Lys Tyr
    15                      20                      25
Lys Gln Leu Tyr Glu Gln Val Ser Ser Thr Trp His Trp
                    30                      35
Thr Cys Thr Asp Gly Lys His Lys Asn Ala Ile Val Thr
    40                      45                      50
Leu Thr Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Arg Asp Asp Phe Leu
    55                      60                      65
Asn Thr Val Lys Ile Pro Asn Thr Val Ser Val Ser Thr
                    70                      75
Gly Tyr Met Thr Ile
    80

```

配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列

GAAATGAAGA GTCTTCAA

18

配列番号 : 4

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA (genomic)

配列

GCGTCCCAGG TTCTGGAG

18

配列番号 : 5

配列の長さ : 28

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA (genomic)

配列

ATACCATGGC CTATCCATTG GATGGAGC

28

配列番号 : 6

配列の長さ : 30

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : DNA (genomic)

配列

ATAGGATCCT TAGGTCTCAG GGGAGTCAGG

30

【図1】

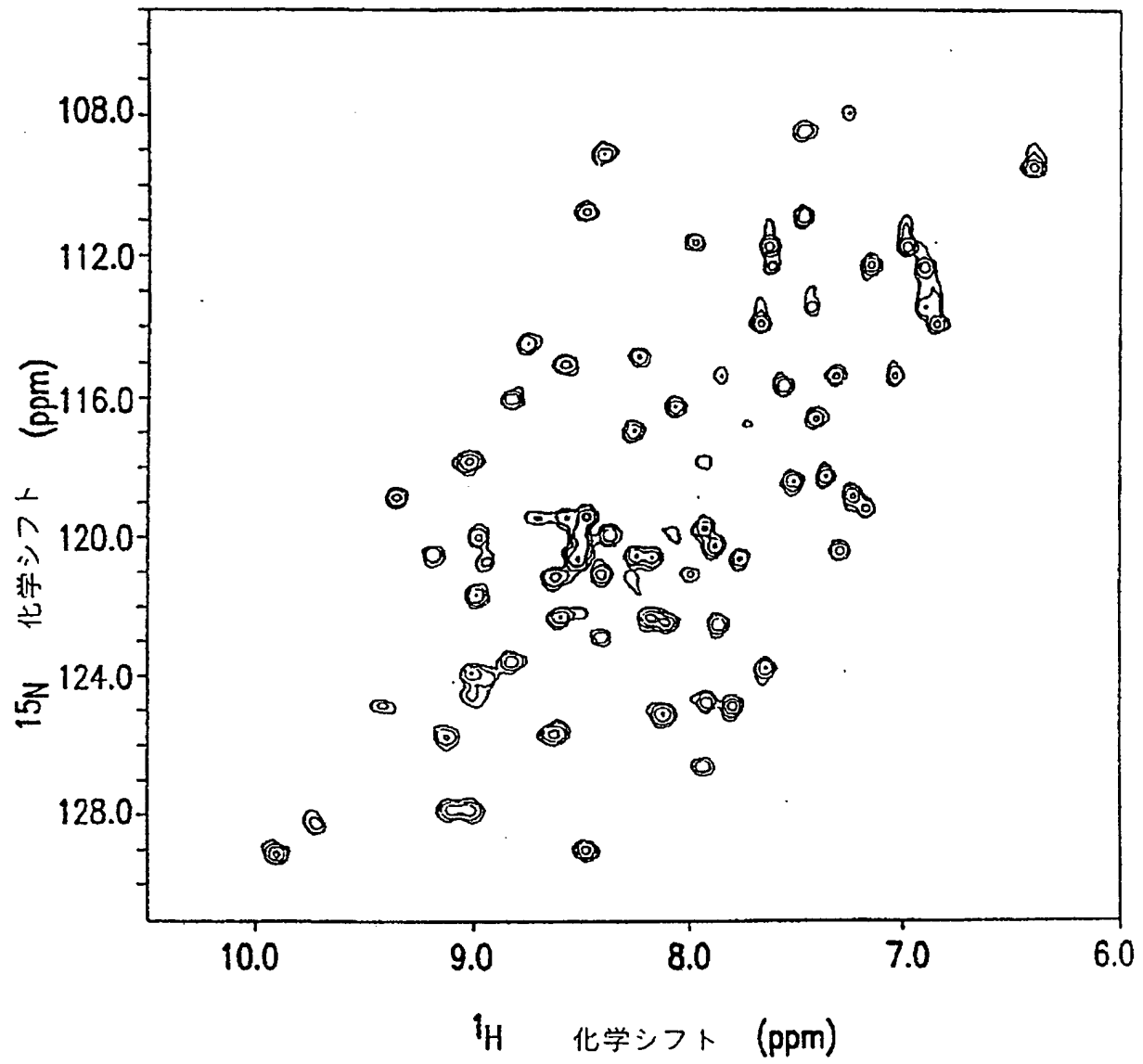


FIG.1

【図2】

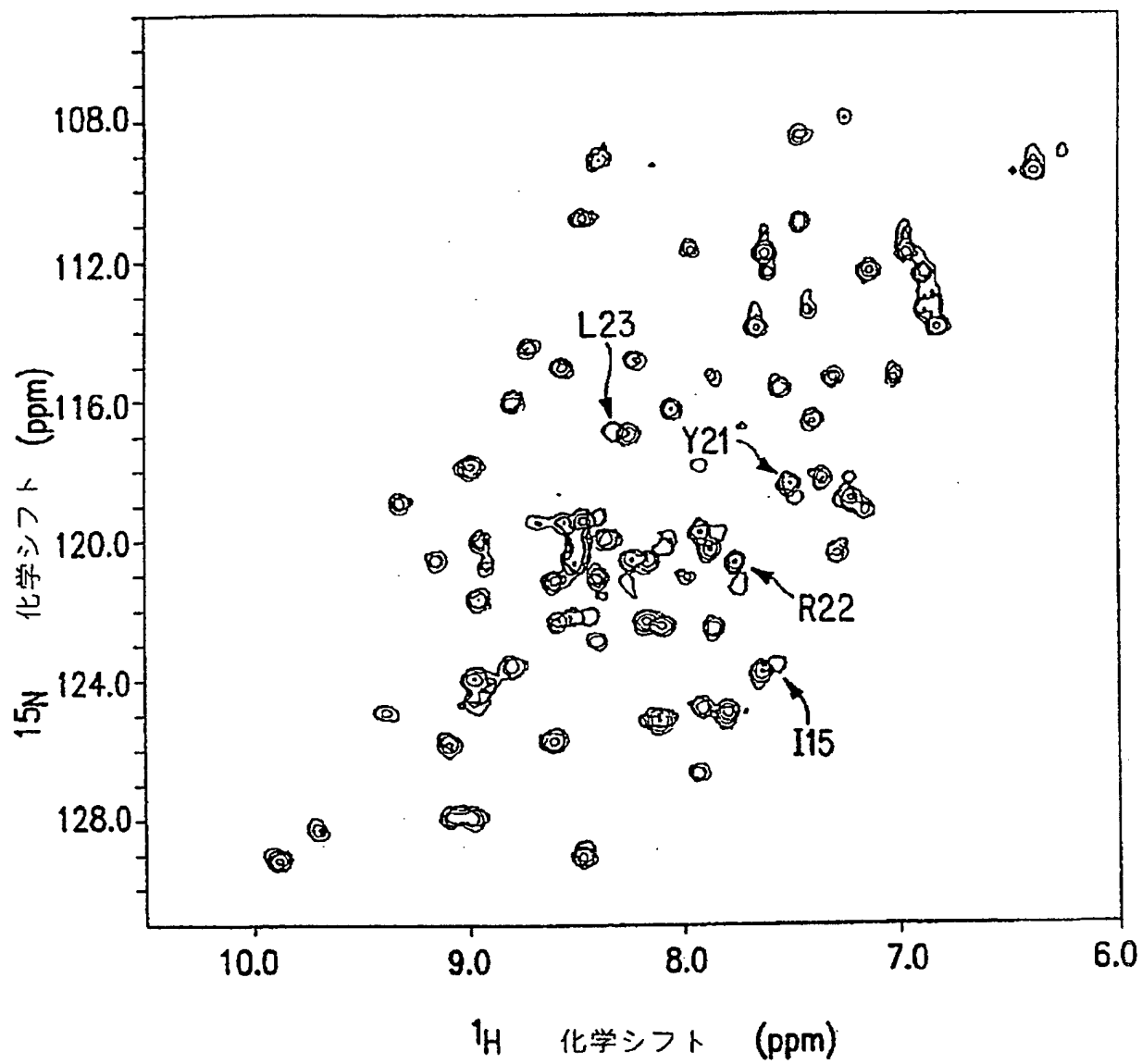


FIG.2

【図3】

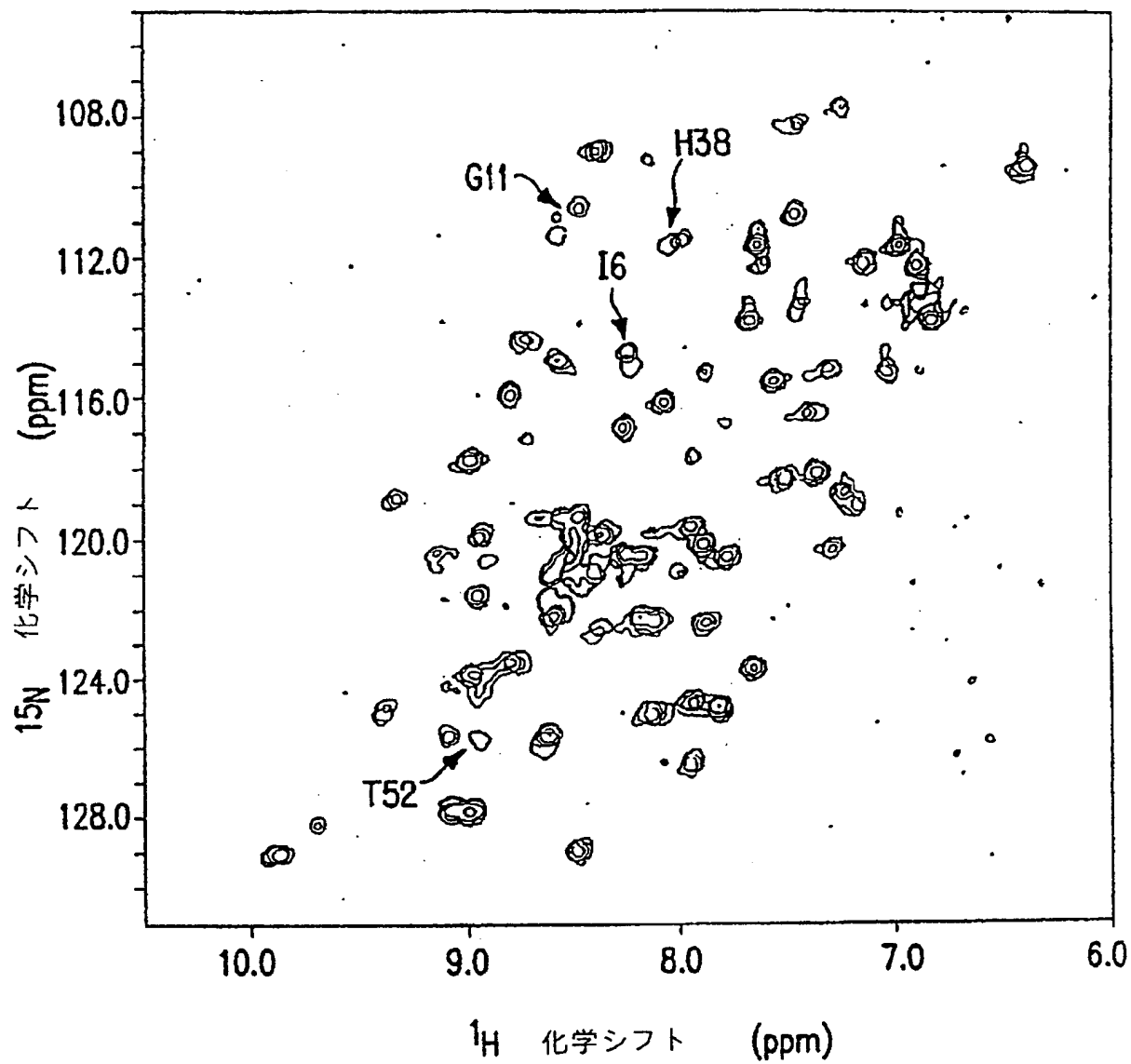


FIG.3

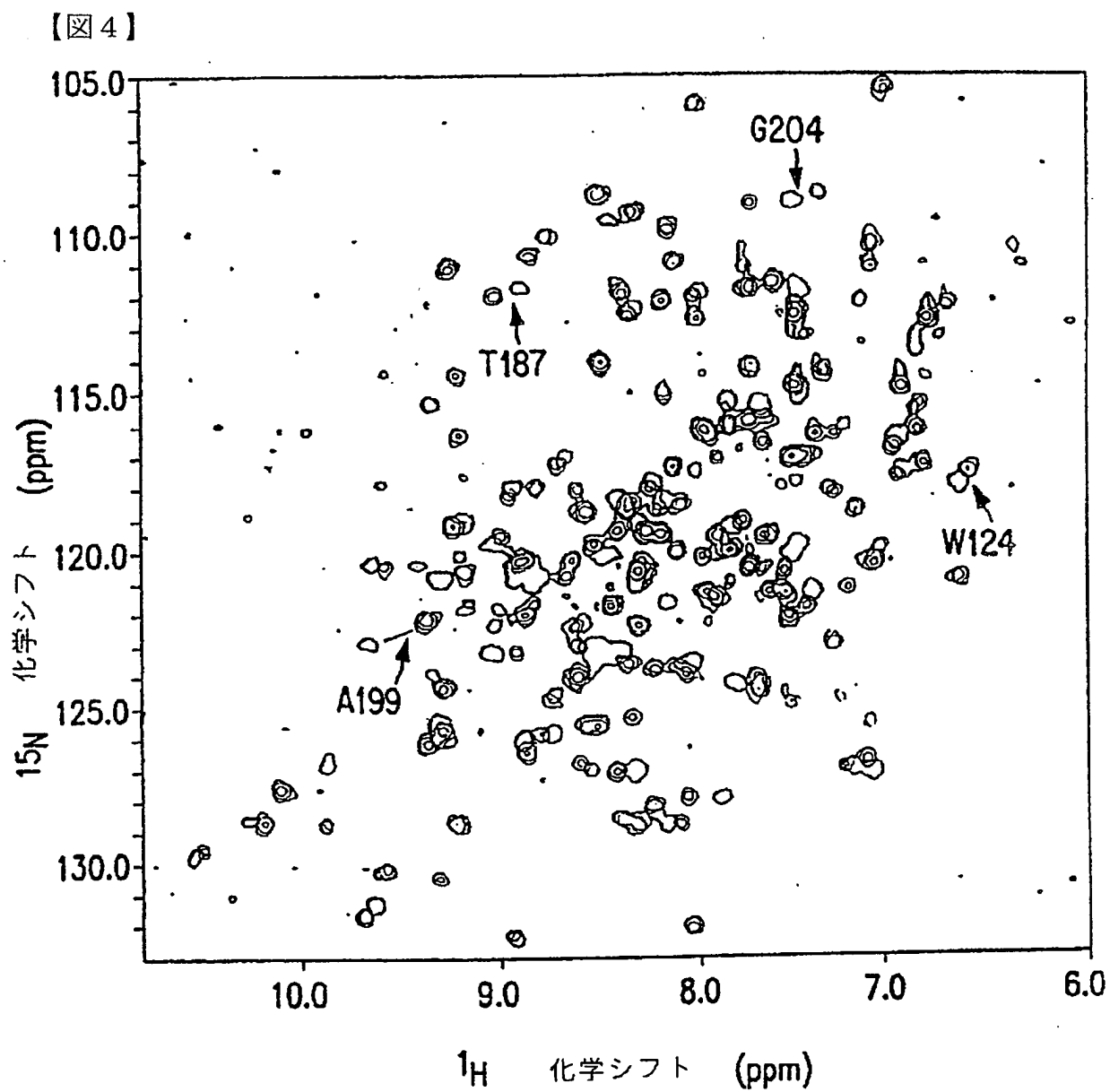


FIG.4

【図5】

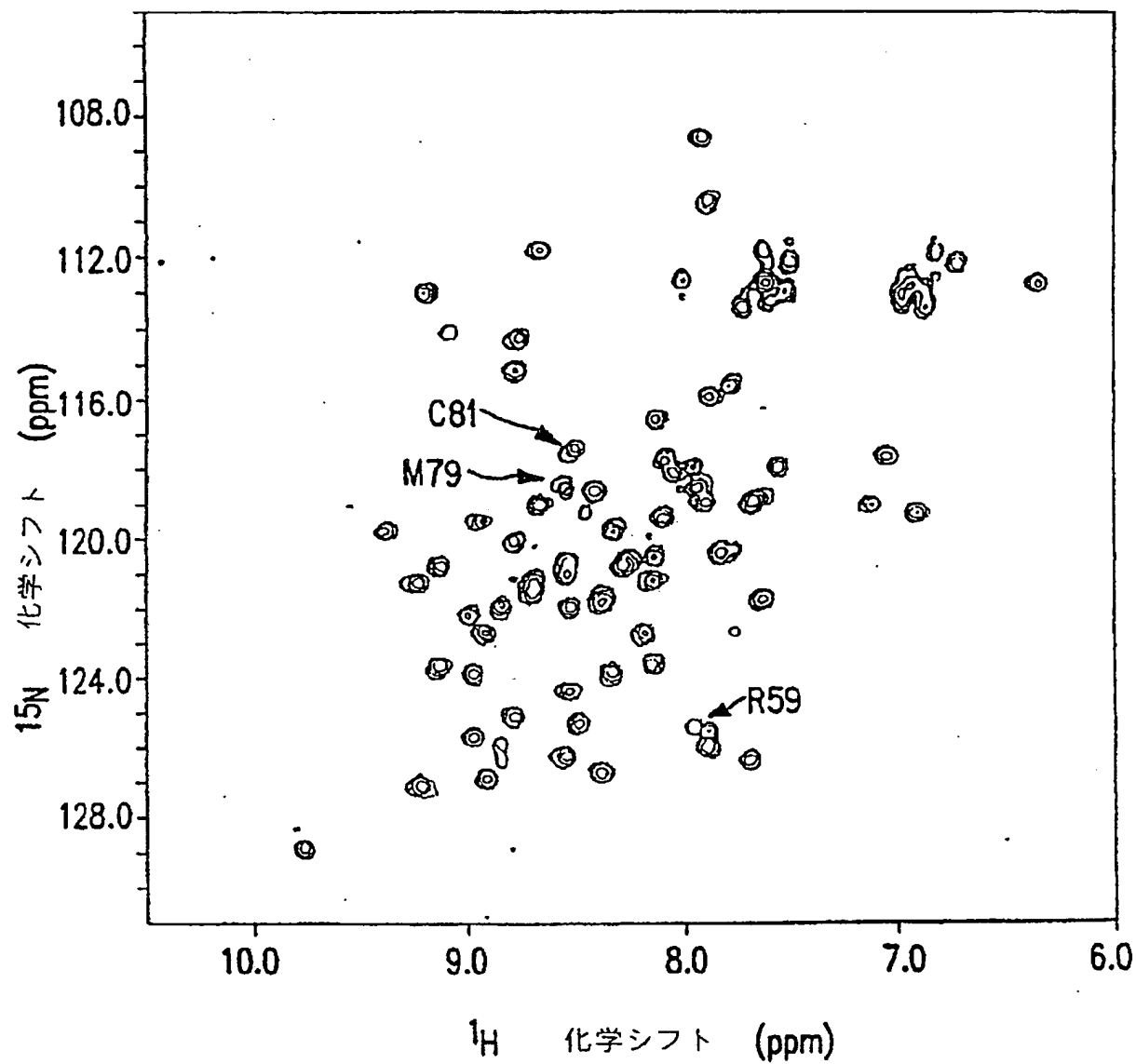


FIG.5

【図6】

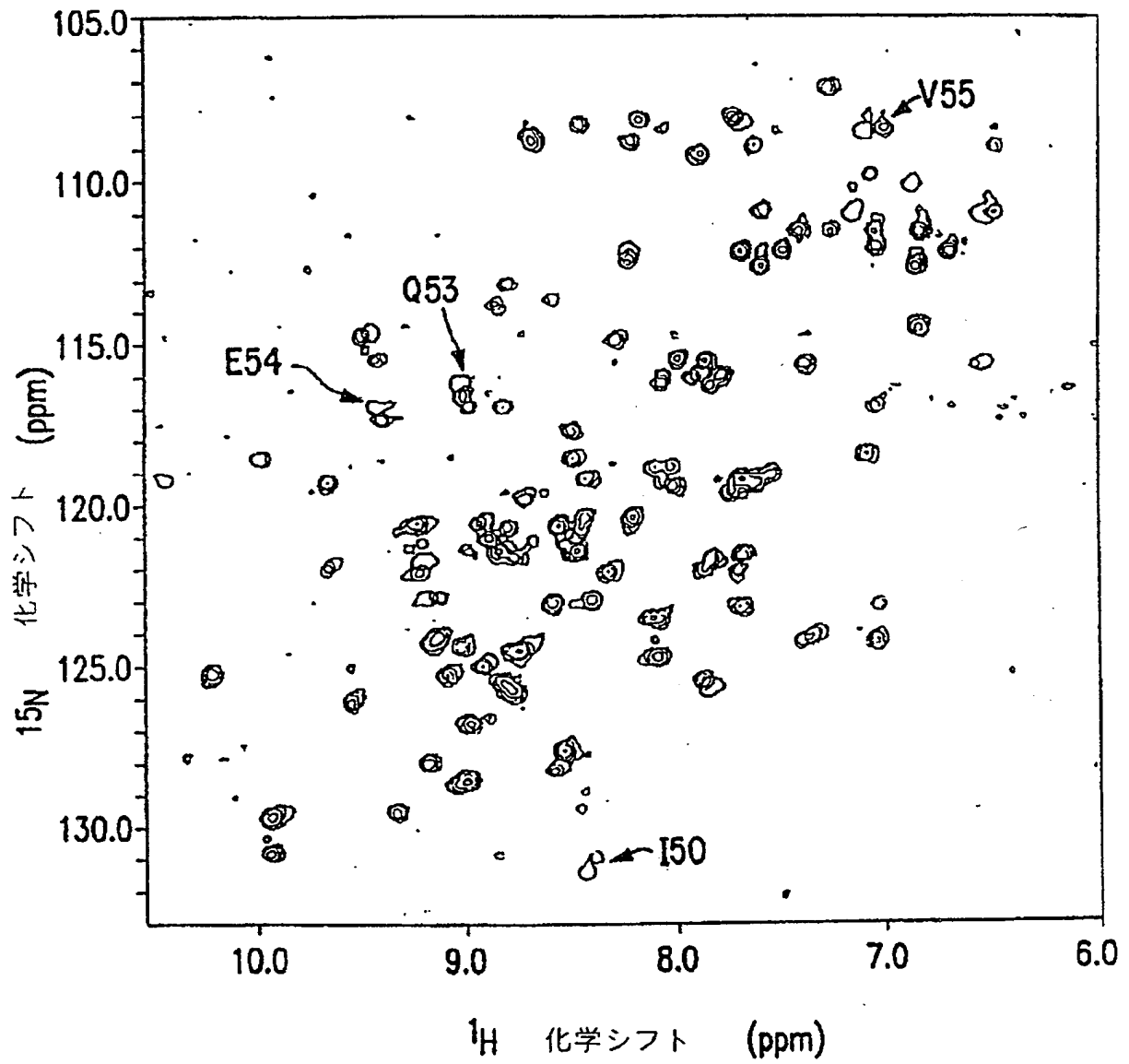


FIG.6

【図7】

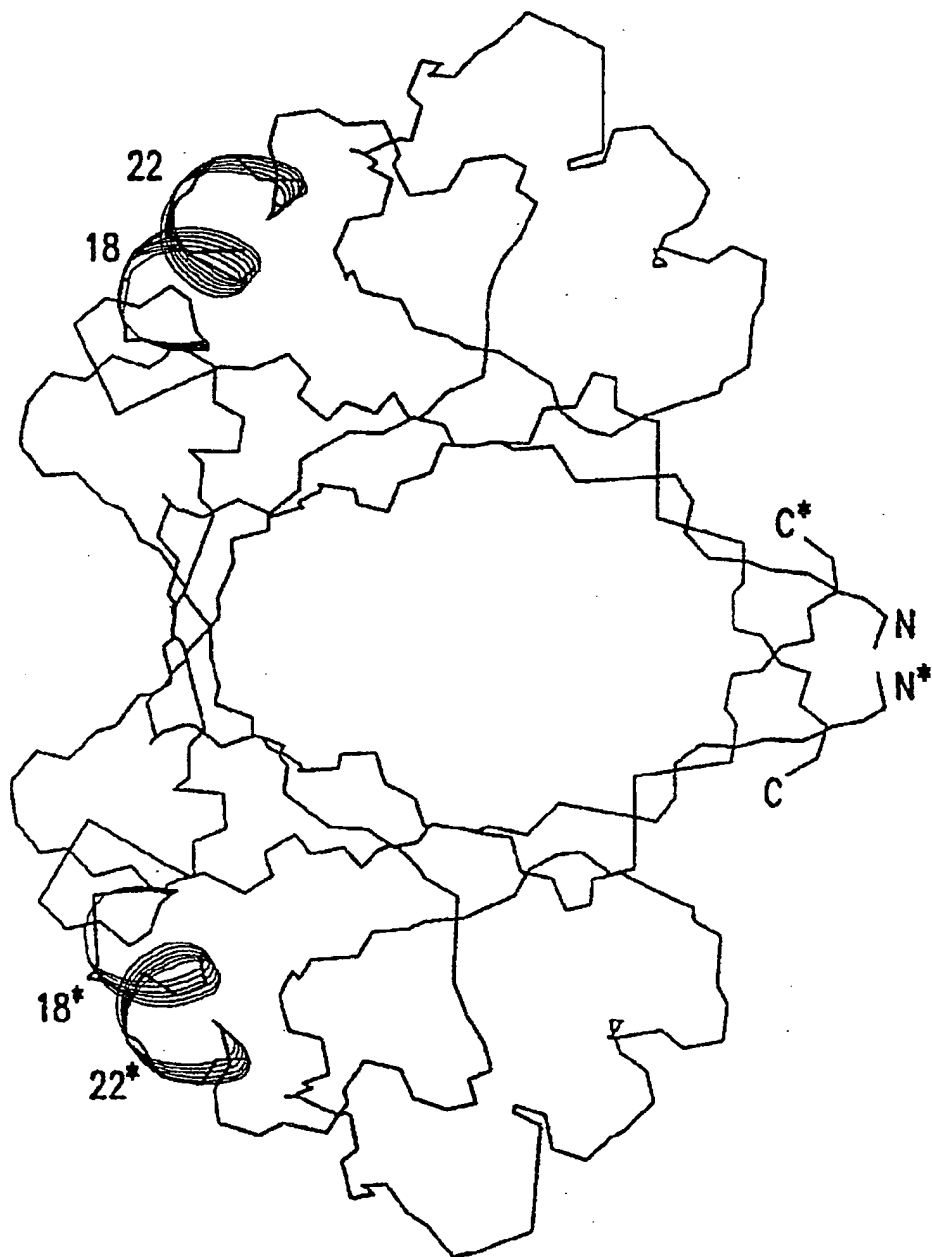


FIG.7

【図8】

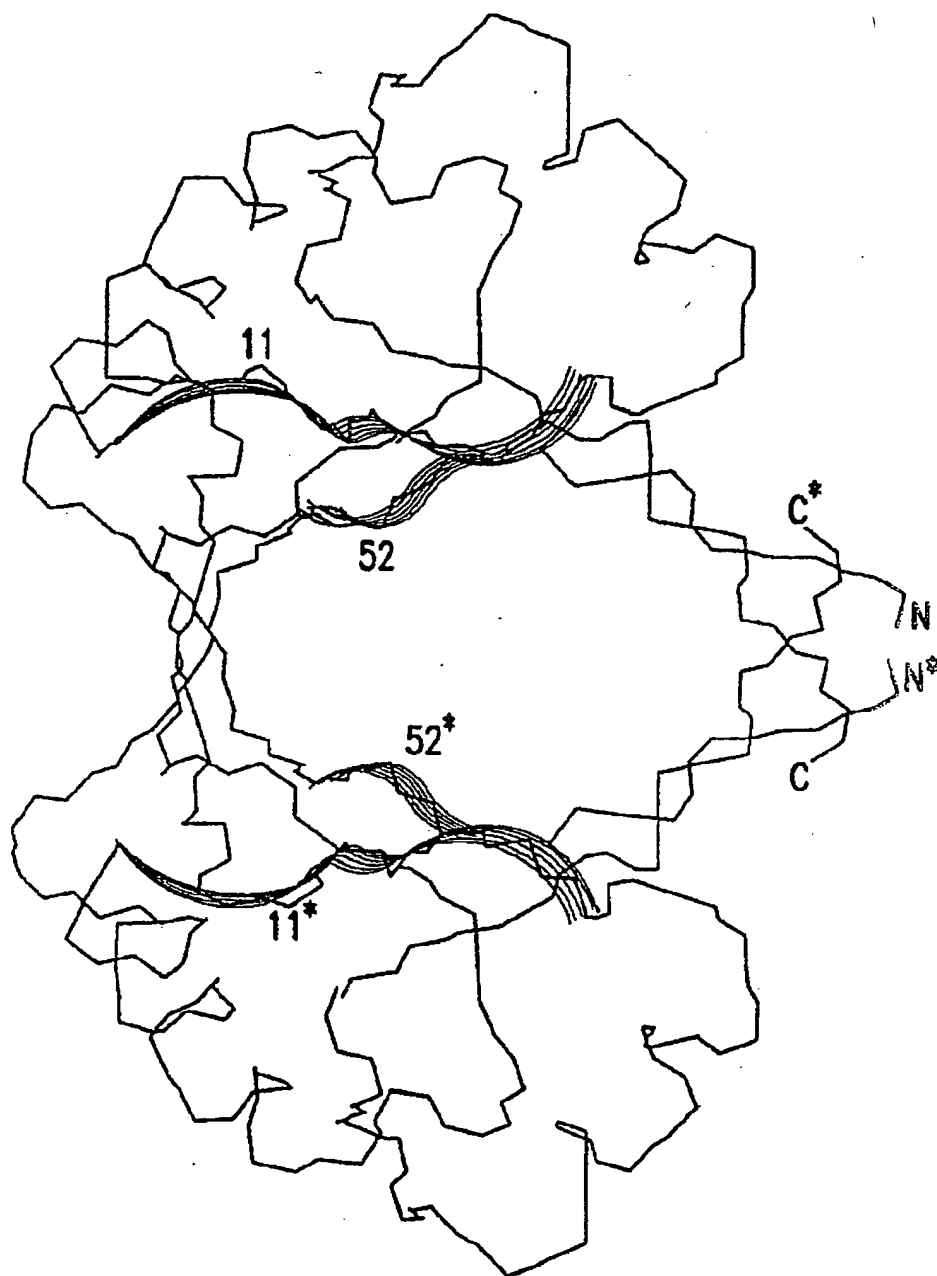


FIG.8

【図9】

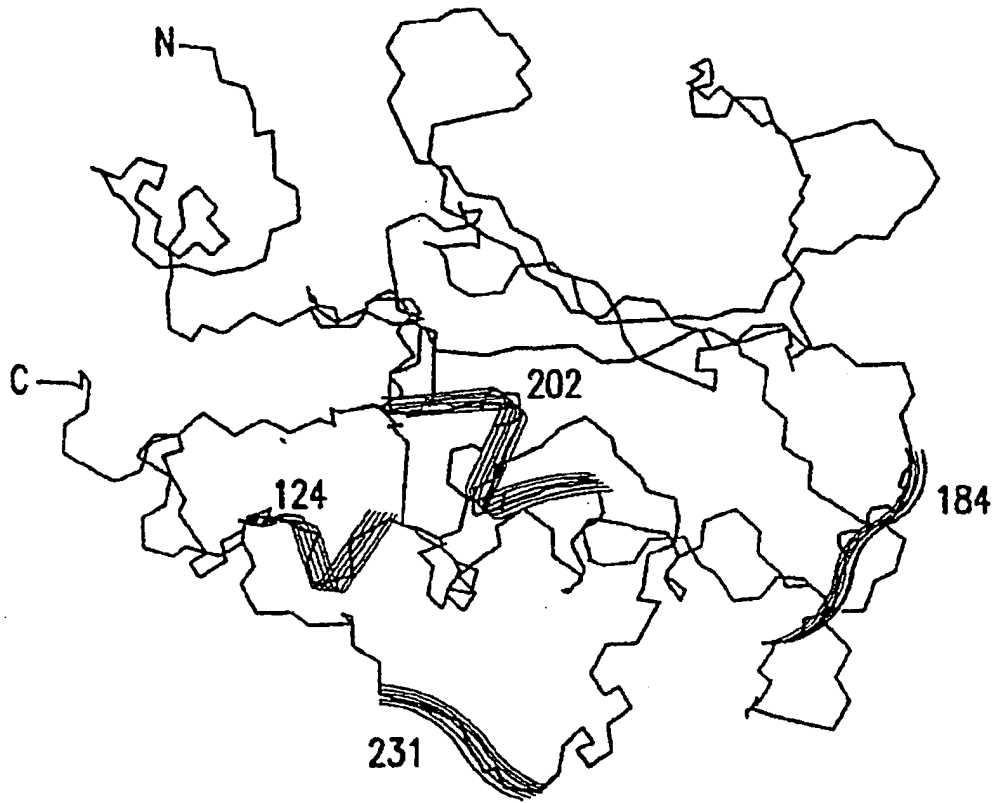


FIG.9

【図10】

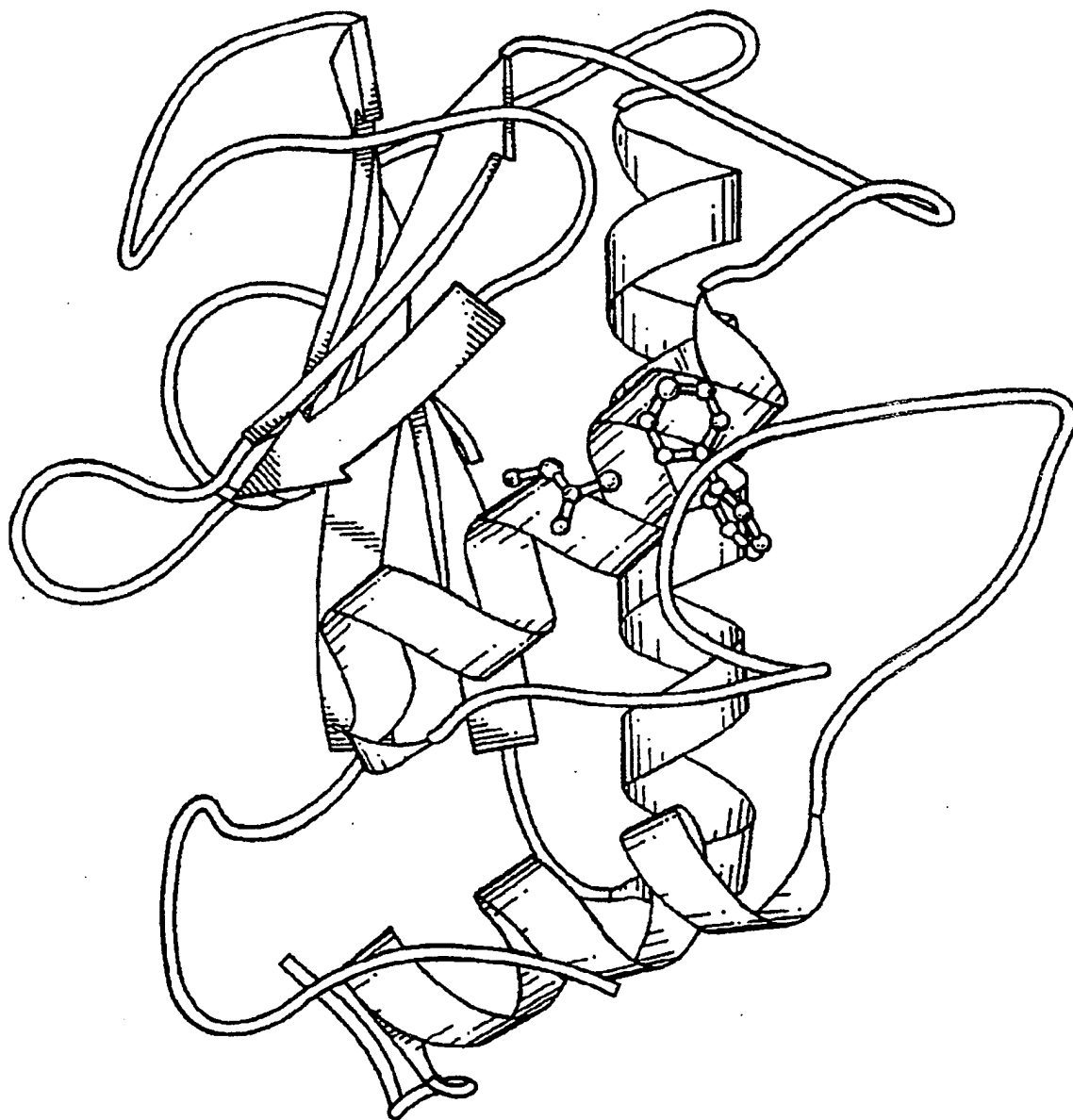


FIG.10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/US 96/18270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/50 G01N33/542

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N G01R A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 17428 A (ADVANCED MAGNETICS INC) 14 November 1991 see the whole document ---	1-7
A	DATABASE INSPEC INSTITUTE OF ELECTRICAL ENGINEERS, STEVENAGE, GB Inspec No. 4560290, FREEMAN D ET AL: "Proton-detected /sup 15/N NMR spectroscopy and imaging" XP002029543 see abstract & JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE, SERIES B, OCT. 1993, USA, vol. 102, no. 2, ISSN 1064-1866, pages 183-192, ---	1-7

-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 April 1997

Date of mailing of the international search report

22.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2210 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/US 96/18270

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE INSPEC INSTITUTE OF ELECTRICAL ENGINEERS, STEVENAGE, GB Inspec No. 3992143, WIDER G ET AL: "Proton-proton Overhauser effects of receptor-bound cyclosporin A observed with the use of a heteronuclear-resolved half-filter experiment" XP002029544 see abstract & JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 5 JUNE 1991, USA, vol. 113, no. 12, ISSN 0002-7863, pages 4676-4678,</p>	1-7
A	<p>WO 91 10140 A (UNIV TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 11 July 1991 -----</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 96/18270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9117428 A	14-11-91	US 5164297 A	17-11-92
		EP 0527208 A	17-02-93
		US 5254460 A	19-10-93

WO 9110140 A	11-07-91	AU 7034791 A	24-07-91
		CA 2072363 A	30-06-91
		EP 0557276 A	01-09-93
		HU 65361 A	02-05-94
		JP 5503691 T	17-06-93
		US 5459077 A	17-10-95
